Année 1957-1958 3me Série N° 94

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

Simone DAUCHY

PHARMACIEN

Assistante à la Faculté de Pharmacie de Nancy
Ex-Interne Lauréate des Hôpitaux
Diplômée d'Etudes supérieures de Chimie biologique
Diplômée d'Etudes supérieures de Microbiologie
Diplômée d'Etudes spéciales de Sérologie et de Microbiologie pharmaceutique et technique

Née le 30 Août 1930 à MÉZIÈRES (Ardennes)

R UNIV BIBLIOTHEEK LEIDEN

Sur la présence de stérols chez un microorganisme (Escherichia coli)

Isolement, caractérisation, discussion.

Soutenue le 8 Juillet 1958 devant la Commission d'Examen

Président . . . . . M. le Doyen KAYSER

Juges . . . . . M. le Professeur BLOCH
Mlle BESSON, Maître de Conférences

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555808_0033

Année 1957-1958 — 2e Série — N° [illegible]

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION « PHARMACIE »

par

Simone BAUCHY

PHARMACIEN

Ancien Élève de l'École de Pharmacie de Paris
Ex-Interne Lauréat des Hôpitaux
Diplômé d'Études supérieures de Chimie biologique
Diplômé d'Études supérieures de Biologie générale
Diplômé d'Hygiène générale et appliquée
Diplômé d'Hygiène sociale et Médecine préventive appliquées à l'enfance

Né le 30 Août [illegible] à [illegible] (Ardennes)

R. Bibl. Université LAVAL

Sur la présence de stérols chez un microorganisme (Cephalosporium acremonium)

Isolement, caractérisation, discussion.

Soutenue le 8 juillet 1958 devant la Commission d'Examen

Président : M. le Doyen BATTEGAY

Assesseurs : M. le Professeur ROCCI

M. le Professeur [illegible], Maître de Conférences

Année 1957-1958 3me Série N° 94

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

Simone DAUCHY

PHARMACIEN

Assistante à la Faculté de Pharmacie de Nancy
Ex-Interne Lauréate des Hôpitaux
Diplômée d'Etudes supérieures de Chimie biologique
Diplômée d'Etudes supérieures de Microbiologie
Diplômée d'Études spéciales de Sérologie et de Microbiologie pharmaceutique et technique

Née le 30 Août 1930 à MÉZIÈRES (Ardennes)

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Sur la présence de stérols chez un microorganisme (Escherichia coli)

Isolement, caractérisation, discussion.

Soutenue le 8 Juillet 1958 devant la Commission d'Examen

Président . . . . . M. le Doyen KAYSER

Juges . . . . . M. le Professeur BLOCH
Mlle BESSON, Maître de Conférences

U N I V E R S I T E de N A N C Y

FACULTE DE PHARMACIE
ADMINISTRATION

Doyen
Professeur : F. KAYSER
Assesseur
Professeur : A. MEUNIER
Secrétaire
P.RADUREAU

PERSONNEL ENSEIGNANT :

Professeurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie Galénique
Mlle	FRANCOIS M. Th.	Matière Médicale
MM.	KAYSER F.	Chimie
	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
	BLOCH J.M.	Toxicologie
	SOLEIL J.	Pharmacie Chimique
	BERNANOSE A.	Physique

MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mlle	BESSON S.	Pharmacodynamie

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

M.	MEUNIER A.	Hydrologie
Mlle	FRANCOIS M.Th.	Hygiène
MM.	KAYSER F.	Biochimie technique
	FRANQUET R.	Cryptogamie
	MARCHAL J.G.	Parasitologie
	STEIMETZ E.	Mycologie-Minéralogie
	BLOCH J.M.	Chimie Minérale
	SOLEIL J.	Chimie Organique
	ROBLOT R. (Professeur à la Faculté de Droit)	Déontologie
	ANZIANI P.	Caractères Analytiques des Sels
	MIRJOLET M.	Chimie Analytique

CHEFS DE TRAVAUX

M.	ANZIANI P.	Chimie
Mme	LASSEUR A.	Microbiologie-Parasitologie
MM.	MIRJOLET M.	Sciences Pharmaceutiques
	BENE R. (Délégué)	Bactériologie et Parasitologie techniques.
	PIERFITTE M. (Délégué)	Chimie Biologique
	VILLOUTREIX J. (Délégué)	Micrographie
	PELT J.M. (Délégué)	Chimie
	HARTEMANN C. (Chargé de T.P.)	Physique

Doyen honoraire: Monsieur le Recteur RICHARD.
Professeur Honoraire: M. CORDEBARD.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les improuver.

A MON MAÎTRE et PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur KAYSER
Doyen de la Faculté de Pharmacie

A MES JUGES

Monsieur le Professeur BLOCH
Professeur de Toxicologie

Mademoiselle BESSON
Maître de Conférences de
Pharmacodynamie

A TOUS MES MAÎTRES
de la Faculté de Pharmacie de Nancy
et dans les Hôpitaux.

Hommage respectueux et reconnaissant.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A TOUS LES MIENS.

- AVANT-PROPOS -

La réalisation de cette thèse n'a été possible que grâce à Monsieur le Doyen KAYSER qui m'en a proposé le sujet et a bien voulu en suivre l'évolution malgré ses lourdes charges administratives.

Monsieur le Professeur BLOCH m'a initiée à l'emploi des rayons X et m'a grandement aidée dans cette partie de mon travail.

Monsieur le Professeur BERNANOSE m'a donné d'utiles conseils au sujet des méthodes physiques que j'ai utilisées.

Mademoiselle BESSON a toujours fait preuve envers moi d'une extrême bienveillance et m'a souvent donné de précieux renseignements.

Monsieur MIRJOLET m'a fait profiter de sa grande expérience d'analyste; il m'a plus spécialement enseigné la manipulation du spectrophotomètre Beckman.

A tous, je renouvelle l'assurance de ma gratitude et de mon respectueux attachement.

Je n'aurais garde d'oublier dans mes remerciements mes camarades du laboratoire de Chimie, en particulier Monsieur PIERFITTE et Monsieur VILLOUTREIX.

o
o o

- INTRODUCTION -

En 1953, ASSELINEAU et LEDERER (1) publient un article très documenté sur la chimie des lipides bactériens et affirment que ces lipides, quoiqu'extrêmement complexes et fort variables, sont toujours caractérisés par une "absence totale de stérols".

De cette absence de stérols chez les bactéries, BEHRING (2) avait déjà conclu en 1930 que ces corps ne sont pas des substances fondamentales de la matière vivante.

Pourtant tous les auteurs ne sont pas aussi affirmatifs en ce qui concerne l'absence de stérols chez les bactéries et la littérature contient à ce sujet de nombreuses publications contradictoires.

A l'attitude catégorique de ASSELINEAU et LEDERER nous semble préférable celle de BERGMANN (3) selon qui, les seuls organismes dans lesquels l'absence de stérols a été prouvée sont Mycobact. tuberculosis var. hominis, probablement Aerobacter aerogènes et quelques algues primitives asexuées.

Le sujet de notre travail nous a été inspiré par les contradictions des données bibliographiques et nous avons voulu reprendre l'étude d'une bactérie peu pathogène, facile à cultiver et chez laquelle la présence de stérols avait été contestée.

Avant d'exposer nos recherches personnelles, il nous a paru

indispensable de rappeler les différents travaux effectués à ce sujet.

Le plan que nous avons adopté est le suivant:

- I - Les stérols chez les bactéries: données bibliographiques;
- II - Analyse sommaire des méthodes de caractérisation et de dosage des stérols.
- III - Obtention de quantités importantes de Escherichia coli dans le but d'y rechercher les stérols.
- IV - Mise en évidence et dosage chez Escherichia coli de corps donnant les réactions des stérols.
- V - Etude du "stérol" isolé de Escherichia coli.
- VI - Essais tentés dans le but d'augmenter la teneur en "stérols" de Escherichia coli.

o
o o

- C H A P I T R E I -

LES STEROLS CHEZ LES BACTERIES :

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

-

Le nombre des stérols connus est fort grand; c'est pourquoi il avait paru commode de les classer selon leur origine en trois grandes catégories: les zoostérols (stérols des animaux dont le représentant le plus répandu est le cholestérol), les phytostérols (stérols des plantes en particulier le stigmastérol et les sitostérols) et les mycostérols (stérols des champignons et des algues presque tous voisins chimiquement de l'ergostérol). Cette classification est peu valable: en effet, la plupart des stérols végétaux se retrouvent chez les Invertébrés; par ailleurs, en 1957, trois savants japonais TSUDA, AKAGI, KISHIDA (4) annoncent la découverte de cholestérol chez une algue rouge Rhodophycea alors que jusqu'ici on n'avait pas encore trouvé de cholestérol dans le règne végétal.

Tandis que la présence de stérols a été prouvée chez tous les êtres pluricellulaires et la plupart des êtres monocellulaires, l'on peut se demander si les bactéries, dont les processus métaboliques sont sensiblement les mêmes que ceux des êtres supérieurs, n'en contiennent réellement pas. Ce problème a intrigué de nombreux chercheurs et la recherche des stérols a été faite sur des microorganismes variés.

Pour plus de clarté dans notre exposé, nous allons envisager successivement chacun des germes qui ont été étudiés.

I - LES MYCOBACTERIACEAE

De par leur forte teneur en lipides (30 à 40% du poids sec),

les Mycobactériaceae semblaient un excellent matériel d'étude. On pouvait en effet espérer une relation directe entre la teneur en lipides totaux et la teneur en stérols.

Dès 1889, HAMMERSCHLAG (5) n'avait pas trouvé de stérols dans Mycobact. tuberculosis var. hominis. PANZER (6), en 1912, travaillant sur une petite quantité du même bacille (2,7 g) isole par action de la digitonine un complexe qu'il décompose ensuite par le xylol bouillant; mais ce complexe ne donne pas la réaction colorée des stérols. TAMURA (7) en 1913 étudie à son tour Mycobact. paratuberculosis var. lacticola et Mycobact. tuberculosis var. hominis et conclut à l'absence de stérols. En 1920, GORIS (8) essaye, lui aussi en vain, d'extraire du cholestérol de Mycobact. tuberculosis var. hominis; toutefois il reconnaît qu'il semble exister à côté du mykol un peu de "cholestérine" qu'il n'a pu isoler.

En effet, il écrit: "Une solution chloroformique d'une faible parcelle des substances lipoïdiques du bacille étudié donne avec l'acide sulfurique une réaction rappelant celle du cholestérol. Après quelques heures, l'acide sulfurique est coloré en jaune et le chloroforme surnageant a une teinte faible lilas violet analogue à celle que donne la cholestérine animale".

De toutes façons, il ne faut pas oublier que les travaux que nous venons de citer datent d'une époque où les réactions colorées des stérols n'étaient pas encore nettement codifiées.

En 1933, CHARGAFF (9) étudiant l'insaponifiable du bacille de Calmette-Guérin montre qu'il ne contient aucune substance donnant les réactions des stérols.

En 1935, HECHT (10) entreprend à son tour des recherches sur Mycobact. tuberculosis var. hominis et var. bovis, sur Mycobact. pseudotuberculosis et sur le bacille de Calmette-Guérin et conclut que les bacilles acido-résistants contiennent des stérols; il n'indique malheureusement pas exactement en quelles proportions, cependant l'article qu'il publie est du plus haut intéret. HECHT montre en effet que certains solvants (éther de pétrole à chaud, chloroforme) extraient les stérols de façon satisfaisante alors qu'il n'en est pas de même par exemple de l'acétone employée à froid.

Aussitôt ANDERSON, SCHOENHEINER, CROWDER et STODOLA (11) reprennent ces travaux et étudient cinq souches différentes de Mycobact. tuberculosis var. hominis; dans les graisses solubles dans l'acétone, ils ne trouvent que 1 partie de stérols pour 624.000 parties de bacilles secs soit $1,3.10^{-6}$, et dans les cires solubles dans le chloroforme, 1 partie pour 870.000 soit $1,1.10^{-6}$; ils en concluent qu'un produit en si petite quantité ne peut être un constituant du bacille et donc que Mycobact. tuberculosis var. hominis ne contient pas de stérols.

Ces auteurs pensent que les minimes quantités de stérols trouvées par HECHT peuvent provenir soit du milieu de culture (qui contient de l'asparagine et de la glycérine) soit des solvants utilisés pour l'extraction des lipides (il en faut en effet de très grands volumes) soit encore du papier filtre employé pour filtrer les bactéries, du coton qui sert à boucher les fioles de Roux, des bouchons utilisés en cours de manipulations, etc...

Les travaux plus récents, par exemple ceux de ASSELINEAU et LEDERER (I2) ceux de AEBI, ASSELINEAU et LEDERER (I3), s'ils conduisent à l'isolement de diverses fractions lipidiques, ne mentionnent pas la recherche des stérols.

II. LES CORYNEBACTERIACEAE

Si contrairement aux Mycobactériaceae les Corynebactériaceae sont relativement pauvres en lipides, la présence de stérols chez elles a été également recherchée. Dans ce cas aussi la littérature renferme des publications contradictoires.

Successivement TAMURA (I4) en I924, BEHRING (I5) en I930, puis CHARGAFF (I6) en I933 ont montré que Corynebact. diphteriae ne contient pas de stérols. Récemment, en I953, GUBAREV, LUBENEC et GALAEV (I7) ont confirmé ces résultats.

Cependant la dernière publication en date qui concerne Corynebact. diphteriae apporte un avis contraire. LUBENEC (I8) en I954 étudie les combinaisons complexes de lipides chez Corynebact. diphteriae; par action de différents solvants il fractionne les lipides et constate que l'une de ces fractions donne avec l'anhydride acétique et l'acide sulfurique concentré la réaction des stérols. Nous nous sommes procuré la traduction de cet article et n'y avons trouvé aucun chiffre, mais nous avons noté que les bactéries sont cultivées sur un bouillon à base de viande, ce qui peut être une source d'erreurs.

III. LES ENTEROBACTERIACEAE

BEUMER et HEPNER (I9), partant de I, I4 g de bactéries sè-

ches isolées de matières fécales, disent avoir obtenu 0,00I g de stérols qui précipitent par la digitonine et donnent la réaction de Liebermann-Burchardt. Ce résultat n'est pas absolument convaincant car on peut penser qu'il s'agit de coprostérol adsorbé sur les bactéries.

C'est pourquoi ces mêmes auteurs reprennent l'expérience sur 5 g de bactéries sèches obtenues elles aussi à partir de matières fécales (donc non exactement définies) et ne trouvent alors pas de trace de stérols.

En I930, BEHRING (20) confirme cette absence de stérols chez Esch. coli.

En I93I, ECKSTEIN et SOULE (2I) dans une étude sur les protides et les lipides synthétisés par Esch. coli disent qu'il est "improbable" que ce bacille contienne aucun des stérols qui peuvent être mis en évidence par la réaction de Liebermann-Burchardt ou par celle de Salkowski; ceci confirme les travaux de MYOSKI (22) qui, partant de IO g de Esch. coli traités par le chloroforme, n'avait pu mettre en évidence de stérols, ni par la précipitation à la digitonine, ni par des réactions colorées.

Plus prudents WILLIAMS, BLOOR et SANDHOLZER (23) qui, en I939, étudient également Esch. coli se contentent d'indiquer n'avoir pas mis en évidence de cholestérol ou autres stérols ce qui, à leur avis, n'exclut pas leur présence mais à une concentration inférieure à 0,3 % de bacilles secs.

Par contre, ici aussi, comme dans le cas des Mycobacteriaceae, HECHT (24) affirme avoir trouvé des stérols chez Esch. coli.

Récemment CMELIK (25) étudie les lipides de Salmonella ty-

phosa et de Salmonella ballerupt et déclare pouvoir affirmer avec certitude que les bacilles typhiques ne contiennent pas de stérols.

IV. LES AZOTOBACTERIACEAE

C'est dans un bacille de cette famille, Azotobacter chroococcum, que la présence de stérols est incontestable.

En effet, SIFFERD et ANDERSON (26) ont isolé de Azotobacter chroococcum un stérol de point de fusion 156°-158°; en réalité c'est un mélange de stérols et d'après la réaction de Salkowski il semble qu'un des constituants essentiels en soit l'ergostérol. Les stérols constituent 0,13 g % des graisses ce qui est une quantité trop importante pour constituer une souillure accidentelle.

En conclusion, la présence de stérols chez les bactéries n'a été prouvée de façon indiscutable que dans un seul cas; nous ne pouvons en effet retenir les travaux de CROWDER et ANDERSON (27) qui cultivent Lactobacillus acidophilus sur un milieu renfermant du lait.

Cependant d'après les données bibliographiques que nous venons de citer, il nous semble impossible d'affirmer avec certitude l'absence des stérols dans la plupart des espèces bactériennes.

Il nous paraît légitime d'adopter une opinion nuancée: si les bactéries renferment des stérols cette teneur est infime ce qui les rend difficilement décelables.

o
o o

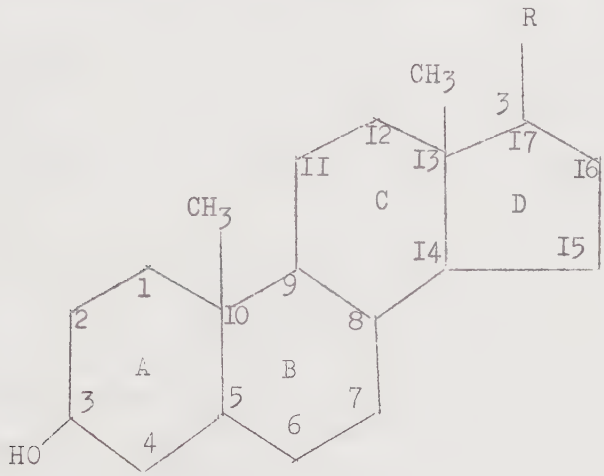
- C H A P I T R E II -

ANALYSE SOMMAIRE DES METHODES DE CARACTERISATION ET DE DOSAGE DES STEROLS

-

Les stérols sont des alcools solides saturés ou non saturés contenant un noyau polycyclique dérivé du cyclopentanoperhydrophénanthrène.

Tous les stérols répondent à la formule générale suivante:



Ils possèdent donc tous

- un groupement hydroxyle en C_3.
- deux groupements méthyle en C_{I0} et C_{I3}.
- une chaîne latérale de 8 à I0 atomes de carbone en C_{I7}.

Par contre ils se différencient entre eux

- par l'existence ou l'absence de doubles liaisons dans le noyau polycyclique
- par l'orientation de l'hydroxyle alcoolique
- par la longueur, les ramifications et la désaturation plus ou moins grande de la chaîne latérale R.

Le terme stéroïde, plus général, a été créé pour désigner les composés possédant le même squelette général mais portant d'autres substituants et des chaînes latérales; la plupart des stéroïdes possèdent un groupement hydroxyle en C_3, cependant ceci

n'est pas une règle absolue.

Les stérols de par leur squelette général possèdent des propriétés communes et c'est sur ces propriétés que sont basées les méthodes de dosage.

Nous allons voir successivement les méthodes basées sur l'emploi de réactions colorées, sur l'emploi de réactions de précipitation, enfin nous indiquerons des méthodes récentes de dosage qui font appel à certaines propriétés physiques des stérols.

I. REACTIONS COLOREES

A. REACTIONS D'HALOCHROMIE ET D'HALOFLUORIE.

En milieu acide minéral concentré ou en milieu anhydre et acide, les stérols donnent de nombreuses réactions colorées; dans ces réactions, les réactifs mis en oeuvre ne participent généralement pas à la formation de dérivés mais provoquent au niveau de doubles liaisons initialement présentes ou formées par déshydratation des phénomènes de mésomérie se traduisant par l'apparition de colorations ou de fluorescences (in PESEZ et POIRIER, tome III, p.227).(28).

A ces réactions l'on a donné le nom de réactions d'halochromie et d'halofluorie; on peut y distinguer les réactions obtenues:

a) sous l'action des acides

b) en présence d'aldéhydes

c) avec des composés divers.

./.

a) Réactions obtenues sous l'action des acides.

I) Acide sulfurique

L'acide sulfurique concentré fournit avec de nombreux stérols des colorations du jaune orangé au rouge. Cette réaction connue depuis longtemps était fort peu employée; cependant, en I953, BERNSTEIN et LENHARDT (29) publient les spectres d'absorption de 220 stéroïdes différents en solution sulfurique et montrent que chaque stéroïde présente un spectre caractéristique; de plus, à des concentrations faibles, l'absorption suit la loi de Beer-Lambert ce qui permet d'utiliser cette réaction colorée pour les dosages.

2) Réaction de Salkowski

Décrite en I872 pour le cholestérol par SALKOWSKI (30) cette réaction s'obtient en agitant une solution chloroformique de stérols avec un égal volume d'acide sulfurique concentré; on obtient, par exemple, dans le cas du cholestérol une coloration rouge du chloroforme et une fluorescence verte de l'acide sulfurique. Quoique DHERE et LASZT (3I) aient montré que le spectre de cette fluorescence est spécifique, cette réaction n'est pas utilisée pour des dosages.

3) Réaction de Liebermann

La réaction décrite par LIEBERMANN (32) en I885 (action sur le cholestérol d'un excès d'anhydride acétique et d'un peu d'acide sulfurique) n'est plus employée actuellement telle qu'elle avait été proposée primitivement.

En I889 BURCHARDT (33) propose de dissoudre le cholestérol dans le chloroforme avant d'y ajouter l'anhydride acétique et l'acide sulfurique. C'est cette réaction connue sous le nom de réaction de Liebermann-Burchardt que GRIGAUT (34) en I9I3 utilise pour le dosage du cholestérol dans le sérum sanguin. Plusieurs facteurs influent sur cette réaction ce qui montre l'importance d'une standardisation rigoureuse; c'est pourquoi de nombreuses mises au point ont été publiées à ce sujet. En I942 MACHEBOEUF et DELSAL (35) étudient l'action des proportions de solvants et d'acide sulfurique, de la température, du temps etc... En I943 SPERRY et BRAND (36) recommandent pour plus d'exactitude de préparer à l'avance un mélange acétylant plutôt que d'ajouter séparément l'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique. En I946 SAIFFER et KAMMERER (37) pour stabiliser la coloration préconisent l'emploi d'un mélange anhydride acétique et dioxane. En I953 IDDLER et BAUMANN (38) proposent de substituer au chloroforme l'acide acétique glacial.

Mais, qu'elle soit plus ou moins modifiée, c'est sur l'emploi de la réaction de Liebermann-Burchardt que sont basées la plupart des méthodes de dosages de stérols.

Cependant pour être complet il nous faut citer encore quelques autres réactions mettant en jeu des acides.

4) <u>Acide phosphorique</u>

En I955 NOWACZYNSKI et STEYERNARK (39) publient les spectres d'absorption de 34 stéroïdes différents mis en solution dans l'acide phosphorique pur et montrent qu'il existe des rela-

tions entre le spectre et la structure chimique des corps étudiés.

5) Réaction de Montignié

En I932 MONTIGNIE (40) propose l'action de l'acide silicotungstique en solution alcoolique sur quelques parcelles de cholestérols; on obtient une belle coloration rouge brun. Dans les mêmes conditions les stérols courants donnent une réaction identique.

6) Réaction de Rosenheim

L'acide trichloracétique est un réactif peu deshydratant et permet ainsi de révéler dans une structure l'existence de doubles liaisons conjuguées ou d'hydroxyles susceptibles d'être éliminés facilement. ROSENHEIM (4I) a mis au point la réaction suivante: une solution d'acide trichloracétique est préparée par dissolution de 9 parties d'acide pur dans I partie d'eau; quand on ajoute ce réactif à une solution chloroformique de stérols il se développe immédiatement dans le cas de l'ergostérol (ou de stérols présentant comme lui deux doubles liaisons conjuguées) une coloration rouge qui graduellement passe au bleu clair.

Les stérols du type cholestérol donnent une réaction négative.

b) Réactions obtenues en présence d'aldéhydes

I) Réaction de Whitby

En I923 WHITBY (42) publie une modification de la réaction de Salkowski; il propose l'addition d'acide sulfurique et de formol à une solution chloroformique de stérols et augmente ainsi la sensibilité de la réaction de Salkowsky.

2) Réaction de Neuberg

L'aldéhyde employé par NEUBERG (43) est le rhamnose: la superposition d'acide sulfurique à une solution alcoolique de cholestérol additionnée de rhamnose donne un anneau rouge.

3) Réaction d'Ohyama

OHYAMA (44) fait agir sur une solution chloroformique de cholestérol l'aldéhyde salicylique en solution dans l'acide sulfurique. La coloration rouge obtenue se prête au dosage colorimétrique.

c) Réactions obtenues avec des composés divers

On a décrit plusieurs réactions en présence de composés divers minéraux ou organiques.

Nous citerons la réaction de LIFSCHUTZ (45) (acide sulfurique + peroxyde de benzoyle) qui permet la caractérisation du cholestérol.

ROSENHEIM (46) propose l'emploi d'hydrate de chloral qui, fondu avec un petit cristal d'ergostérol, donne une coloration d'abord rouge puis bleue et finalement verte. Cette réaction révèle l'existence de doubles liaisons conjuguées ou d'hydroxyles susceptibles d'être éliminés facilement.

En 1953 ZLATKIS, ZAK et BOYLE (47) proposent, pour le dosage du cholestérol dans le sérum, l'action du perchlorure de fer; la méthode consiste à additionner un volume fixe d'acide sulfurique, d'acide acétique et de perchlorure de fer à un mélange de sérum et d'acide acétique; on obtient rapidement une coloration pourpre qui permet le dosage.

B. EMPLOI DE REACTIFS SALINS

Les réactions colorées obtenues par l'action de réactifs métalliques sur les stérols ne peuvent être classées parmi les réactions d'halochromie; elles en sont cependant très proches.

TSCHUGAEFF (48) a montré que l'addition de chlorure d'acétyle et de chlorure de zinc à une solution acétique de cholestérol développe une coloration rose ou rouge, puis une fluorescence verdâtre. A de faibles concentrations la coloration obtenue respecte la loi de Beer-Lambert, ce qui a permis à MILDBRANDT (49) d'utiliser cette réaction colorée pour le dosage du cholestérol sanguin.

LAMB, MUELLER et BEACH (50) montrent que les solutions chloroformiques de différents stérols traitées par un mélange de trichlorure d'antimoine et de chlorure d'acétyle présentent des spectres d'absorption caractéristiques, la mesure spectrophotométrique des densités optiques des maxima d'absorption en permet le dosage.

II. REACTIONS DE PRECIPITATION

La littérature indique plusieurs méthodes qui permettent de doser les stérols par précipitation et l'on a longtemps admis qu'elles mettaient obligatoirement en jeu un hydroxyle alcoolique; en fait ceci n'est pas une règle absolue et MATHIEU, PETIT, POIRIER et VELLUZ (5I) indiquent que certains cétostéroïdes donnent aussi des réactions de précipitation.

PICARD et SEYMOURD (52) proposent de précipiter les stérols à l'aide d'acide oxalique; en solution éthérée, cet acide donne avec le cholestérol une combinaison 2 $C_{27}H_{46}O$ + $C_2H_2O_4$ cristalli-

sant en aiguilles plates.

FABRE (53) par addition d'une quantité suffisante de solution éthérée d'acide cyanique à une solution éthérée de cholestérol obtient un précipité d'allophanate de cholestérol.

Mais la méthode classique est celle de Windaus-Caminade qui repose sur l'emploi du digitonoside. En I9IO, WINDAUS (54) montre que le cholestérol fournit avec le digitonoside un composé d'addition équimoléculaire très peu soluble dans l'alcool; le dosage peut ensuite se terminer soit par pesée: CAMINADE (55) soit par colorimétrie: SCHOENHEIMER et SPERRY (56) soit par oxydation chromique totale: KAYSER et MATHIEU (57) ou partielle: THIVOLLE et WEISKOPF (58) soit encore par néphélométrie: COSTELLO et GURAN (59).

En I946 DELSAL (60) propose de substituer au digitonoside la natigine qui donne sensiblement les mêmes résultats.

Récemment SCHULZ (6I) propose l'emploi de la tomatine qui, avec le cholestérol, donne une combinaison insoluble dans l'alcool à 96e; la tomatine présente d'ailleurs avec le digitonoside une différence fondamentale: alors que le digitonoside ne précipite que les stérols possédant un OH trans, la tomatine précipite également les stérols ayant un OH cis.

III. METHODES PHYSIQUES

A. Spectrophotométrie dans l'infrarouge

Cette méthode a été décrite en I955 par GUY, DELTOUR et WEINMANN (62) pour le dosage du cholestérol dans le sérum sanguin.

Le spectre infrarouge du cholestérol présente dans la région de 6,8 à II μ un certain nombre de bandes d'absorption qui peuvent servir au dosage; la bande dont le maximum est situé à 9,49 μ possède un coefficient d'extinction élevé et de plus elle est peu sensible aux impuretés éventuelles; c'est donc elle que les auteurs ont choisie pour établir des courbes d'étalonnage.

B. Mesure de tension superficielle

Les lipides s'étalent à la surface de l'eau en formant un film très étendu. En I950 JONES (63) montre que dans des conditions bien déterminées la mesure de la surface de ce film pourrait permettre un dosage des stérols contenus dans les lipides totaux.

Aussitôt SEAMAN (64) applique cette méthode à la détermination des stérols chez Tetrahymena geleii. Des expériences faites avec du cholestérol pur montrent que un pouce carré de film (soit 6,45I cm^2) correspond à I,04 μg de cholestérol.

Cette méthode séduisante à cause des faibles quantités de stérols qu'elle met en oeuvre semble devoir être trop influencée par des traces d'impuretés tensioactives pour n'être pas fort suspecte lors de son emploi en biochimie.

o
o o

- C H A P I T R E III -

OBTENTION DE QUANTITES IMPORTANTES DE ESCHERICHIA COLI DANS LE BUT D'Y RECHERCHER LES STEROLS.

-

I. CHOIX DU MICROORGANISME

Les références que nous avons citées dans notre premier chapitre montrent que la recherche des stérols chez les bactéries a été faite sur différents microorganismes.

Personnellement deux impératifs nous ont guidée dans le choix du germe à analyser.

D'une part, puisque nous savions d'avance que les bactéries si elles renferment des stérols n'en contiennent que très peu, il nous fallait choisir, afin d'obtenir en peu de temps un matériel d'étude relativement abondant, un germe qui se développe rapidement. Esch. coli répond à cette exigence puisque en moins de 24 heures il atteint son maximum de croissance.

D'autre part, pour éviter toute cause possible d'erreur, il importait avant toute chose d'utiliser un milieu absolument dépourvu de stérols ; donc ne renfermant pas de produits organiques plus ou moins complexes tels que les peptones, extraits de levures, oeufs, bouillons de viande etc... qui entrent dans la composition de nombreux milieux classiques en bactériologie.

Il nous a paru indispensable d'employer un milieu synthétique et ne contenant que des molécules très simples que le commerce livre pures. Or s'il est peu de germes qui sur un tel milieu présentent une croissance normale, Esch. coli peu exigeant se développe parfaitement bien sur un milieu relativement pauvre. Une même souche (I) d'Esch. coli avait déjà été utilisée dans plusieurs thèses réalisées au laboratoire de Monsieur le Doyen KAYSER. C'est cette souche que nous avons employée.

(I) Cette souche, étiquetée J3 dans la collection du Laboratoire de Microbiologie avait été fournie par Monsieur le Professeur

II. CHOIX DU MILIEU DE CULTURE

De nombreux milieux ont été proposés. PHAM GIA (65) a montré que quel qu'il soit ce milieu doit toujours renfermer:

- un sel de magnésium qui joue le rôle d'un stimulant
- un glucide ou un acide organique comme source de carbone énergétique
- un sel d'ammonium en tant que source d'azote.

Dans notre laboratoire il est habituel d'utiliser le milieu synthétique de TULASNE et WURTZ (66) en y remplaçant l'urée par du sulfate d'ammonium.

Le milieu que nous avons adopté a donc la composition suivante:

PO_4KH_2	I g
ClK	0,50 g
SO_4Mg	0,50 g
$SO_4(NH_4)2$	4,73 g
$PO_4Na_2H,I2\ H_2O$	25 g
Eau distillée QS	I.000 ml.

Par suite de la forte teneur en phosphates, il se produit pendant la stérilisation une précipitation assez abondante. Il faut donc pour la préparation de ce milieu procéder en deux temps: le milieu (sans glucose) est d'abord porté pendant 20 minutes à I20°, filtré après refroidissement pour éliminer le précipité formé, additionné de glucose et finalement stérilisé 20 minutes à I05°.

Dans nos premiers essais, lorsque notre but était de démon-

trer la présence de stérols chez Esch. coli, la source de carbone était le glucose à raison de 10 g p.1000. Par suite, dans le but de faire varier la teneur en stérols, nous avons substitué au glucose différents substrats carbonés.

Ainsi dans notre milieu habituel le seul produit organique employé est le glucose. A l'instar de SIFFERD et ANDERSON (67) nous avons vérifié qu'il ne contient pas de stérols en procédant de la façon suivante: 100 g de glucose et 200 ml d'éther sulfurique sont laissés en contact pendant 4 jours. On filtre sur Büchner et on lave le glucose avec 200 ml d'éther sulfurique. Après évaporation de l'éther, il reste un très faible résidu qui ne fournit pas de réaction de Liebermann et ne précipite pas par la digitonoside.

III. MODE DE CULTURE

Dans nos toutes premières expériences nous avons procédé à des cultures sur boîtes de Roux en additionnant à notre milieu synthétique 20 g p.1000 de gélose. La présence de stérols (fucostérol) dans l'agar-agar nous a fait abandonner très vite ce mode de culture car nous voyions là une source d'erreur possible.

Nous avons ensuite cultivé Esch. coli en ballons de trois litres. Esch. coli qui est à la fois aérobie et anaérobie se développe très bien dans ces deux conditions; cependant une aération du milieu qui en réalise un brassage accélère la croissance; à l'aide d'une trompe à vide nous faisons donc arriver dans nos milieux un courant d'air filtré sur coton stérile.

En moyenne un ballon contenant 2,5 litres de milieu fournit dans nos conditions de culture à peine plus d'un gramme de colibacilles secs; il nous a donc fallu envisager un mode de culture à l'échelle semi-industrielle.

Pour cela, nous avons fait construire un vaste récipient qui nous permet d'ensemencer en une seule opération 50 litres de milieu. Cet incubateur a été réalisé en tenant compte des observations publiées par CHAIN, PALADINO, CALLOW, UGOLINI et VAN DER SLUIS au Ie Symposium international de Chimie microbiologique (68). Dans cet article les auteurs comparent différents systèmes d'aération pour conclure finalement que l'agitation par rotation d'une hélice permet une aération efficace et économique en supprimant l'emploi d'un appareil d'aération. Ils étudient également la vitesse de rotation de l'hélice, sa forme etc...

L'incubateur que nous avons fait construire par les Etablissements Nor Fru à Nancy est une cuve cylindrique en fonte revêtue intérieurement de matière plastique (araldite). Cette cuve est fermée par un couvercle mobile, assujetti par des boulons (l'étanchéité étant assurée par un joint de caoutchouc). Le couvercle est percé d'un orifice central qui laisse passer l'axe de l'hélice et de deux orifices latéraux: l'un fileté reçoit le thermomètre, l'autre sert au remplissage de l'appareil. Le fond de la cuve est légèrement concave et la vidange se fait par une tubulure inférieure en acier inoxydable (qui peut être raccordée directement à la supercentrifugeuse Sharples).

Le chauffage à 37° est assuré par une résistance immergée entourée d'une gaine d'acier inoxydable.

La hauteur de la cuve est de 600 mm et son diamètre de 400 mm. (voir croquis page 26).

Les caractéristiques essentielles de notre incubateur sont les suivantes:

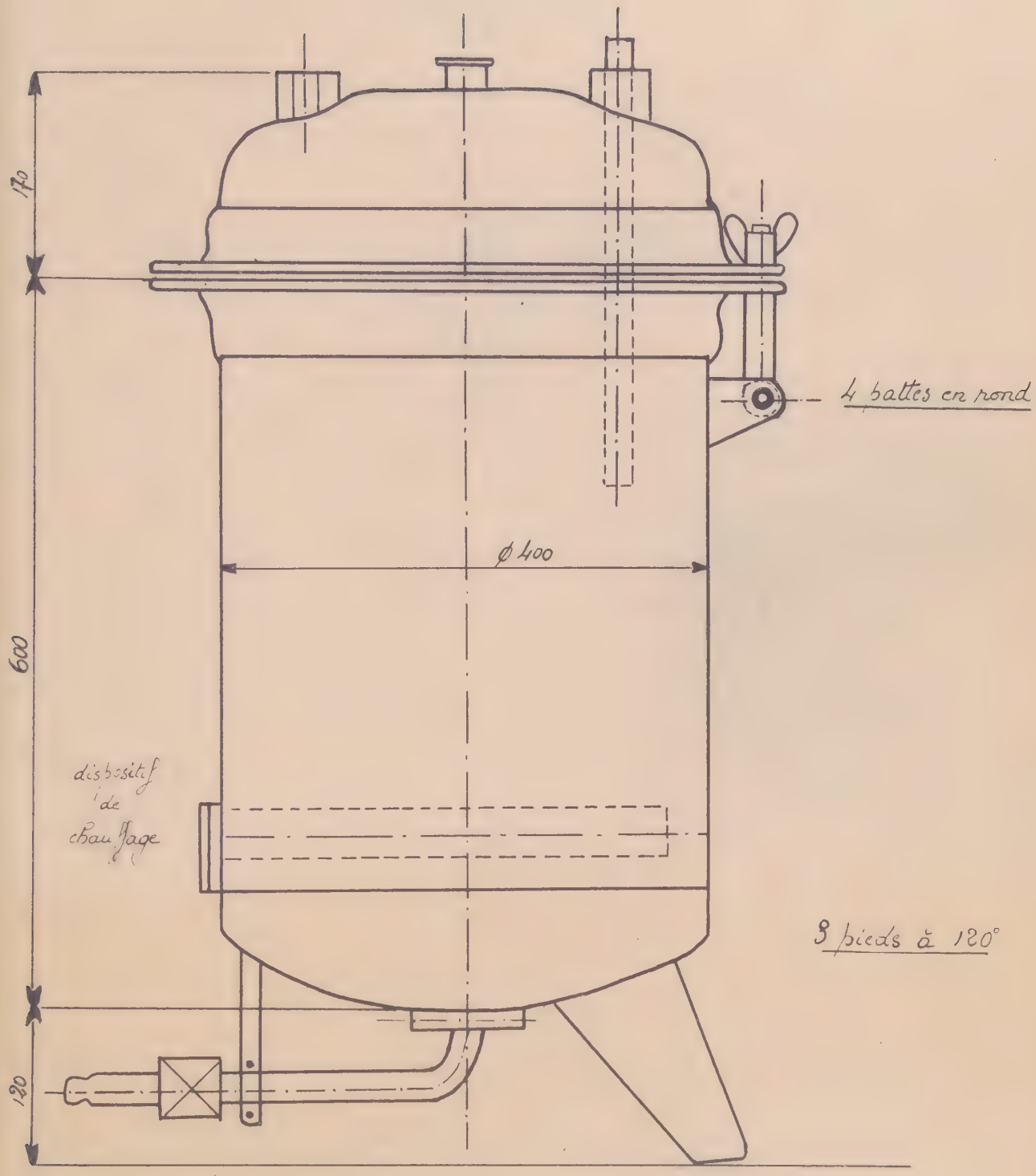
- Pas d'appareil d'aération
- Une hélice du type turbine dont le diamètre est de 100 mm. Elle porte 8 ailettes inclinées à 90°; cette hélice tourne à mi hauteur du liquide avec une vitesse de 700 tours par minute.

Etant donné l'ensemencement massif effectué (deux litres de culture âgée de 18 heures pour 50 litres de milieu) et la pauvreté relative du milieu (qui est entièrement synthétique et ne permet donc pas en 24 heures le développement de levures ou de champignons), nous avons estimé légitime d'employer des milieux non stériles. La stérilisation de cinquante litres de milieu posait en effet des problèmes d'ordre pratique que nous ne pouvions résoudre.

L'emploi de cet incubateur nous permet non seulement de travailler sur une grande quantité de milieu mais encore grâce à l'agitation d'obtenir un rendement microbien relativement satisfaisant.

Alors qu'en tubes (donc en milieu non aéré) la densité optique d'une culture âgée de 24 heures (lue au spectrophotomètre Coleman junior à 610 mμ) est en moyenne de 0,35 nous obtenons par emploi de l'incubateur, en 24 heures, une densité optique variant de 0,55 à 0,60.

./.


170
600
120
4 battes en rond
ø 400
dispositif de chauffage
3 pieds à 120°

IV. RECOLTE DES GERMES

La récolte des germes est faite après 24 heures de culture car à ce moment le développement microbien a atteint son maximum.

Qu'il s'agisse de culture en ballons ou dans l'incubateur la récolte se fait à l'aide d'une supercentrifugeuse Sharples.

Au début de nos expériences, il nous était facile de lyophyliser la totalité des germes recueillis et par une simple pesée de connaître ainsi le poids sec de bacilles mis en oeuvre.

Par suite, opérant sur des quantités de bacilles plus importantes, nous avons préféré peser la récolte à l'état humide et l'utiliser telle quelle pour l'extraction des lipides. Un extrait sec effectué sur une fraction de cette récolte nous donne le poids de bacilles secs correspondant à la récolte humide.

o
o o

- C H A P I T R E IV -

MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE CHEZ ESCHERICHIA COLI DE CORPS DONNANT LES REACTIONS DES STEROLS

-

De nombreux essais préliminaires nous ont montré qu'il était toujours possible de mettre en évidence chez Esch. coli des corps se comportant comme des stérols à condition de partir de prises d'essai assez importantes et de faire des extractions assez soigneuses. En effet, la teneur de Esch. coli en "stérols"(x) est très faible aussi leur mise en évidence et plus encore leur dosage sont très délicats.

Dans ce chapitre nous montrerons que nous pouvons constamment isoler de Esch. coli des quantités dosables de corps localisés dans l'insaponifiable, fournissant un précipité avec le digitonoside et une réaction de Liebermann-Burchardt; nous réserverons pour le chapitre suivant la discussion concernant la nature stérolique de ces corps et les tentatives d'identification.

La difficulté essentielle provient de ce que les stérols sont toujours extraits en même temps que des quantités relativement considérables de lipides dont il faut les débarrasser avant le dosage, ce qui est extrêmement laborieux.

Dans ce chapitre, nous étudierons donc successivement:

I. L'extraction des lipides totaux

II. La saponification

III. La chromatographie de l'insaponifiable

IV. Le dosage des stérols isolés

V. Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus.

(x) Pour des raisons de commodité nous emploierons, dans la suite de notre exposé, ce terme alors qu'il serait plus correct d'écrire corps donnant les réactions des stérols.

I. EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX

Les modalités d'extraction des lipides contenus dans les êtres vivants, qu'il s'agisse ou non de bactéries, sont variées à l'infini et l'on peut dire que chaque auteur emploie une technique différente.

Certains auteurs n'emploient qu'un seul solvant ainsi OTTKE, TATUM et ZABIN (69) extraient les stérols de Neurospora par de l'acétone au Soxhlet pendant 48 heures. PANZER (70) épuise Mycobact. tuberculosis var. hominis par l'éther au Soxhlet.

Pour nous une règle nous a semblé essentielle: seul l'emploi successif pendant un temps prolongé de plusieurs solvants appropriés permet de réaliser un dégraissage total. AUCLAIR et PARIS (7I).

Nous avons employé successivement deux techniques différentes:

Dans nos premières expériences, nous partions de bactéries lyophylisées et nous avons adopté le schéma d'extraction suivant:

Les bactéries lyophylisées sont d'abord extraites à froid pendant 48 heures par de l'alcool à 95°; après cette première extraction la masse bactérienne est introduite dans la cartouche d'un Kumagawa et soumise à l'action de l'éther de pétrole pendant 6 heures, puis à l'action de l'acétone pendant 3 heures (cette extraction par l'acétone est répétée à trois reprises). Finalement la masse bactérienne résiduelle subit une

hydrolyse acide et l'hydrolysat ainsi obtenu est extrait par de l'éther sulfurique.

A titre d'exemple indiquons les conditions opératoires que nous avons employées dans une expérience portant sur 105g de bactéries sèches; les épuisements et extractions ont été faits successivement par :

- 450 ml d'alcool à 95°
- 600 ml d'éther de pétrole
- et 3 fois 750 ml d'acétone.

Le résidu a ensuite été soumis à une hydrolyse acide par action de 250 ml d'acide chlorhydrique à 20% pendant deux heures au bain-marie bouillant à reflux. Après deux heures, le résidu filtré sur une cartouche a été extrait au Kumagawa par 300 ml d'éther de pétrole; d'autre part, la solution acide neutralisée et versée dans une ampoule à décantation a été extraite par 4 fois 100 ml d'éther sulfurique. Finalement toutes les liqueurs d'extraction réunies ont été évaporées sous vide partiel avec un lent courant de gaz carbonique.

La lyophylisation étant une opération très longue si l'on ne dispose pas d'une installation spécialement conçue à cet effet, nous avons cherché par la suite, puisque nous devions traiter d'assez grandes quantités de bacilles, à opérer sur les bactéries telles qu'elles nous sont livrées par la supercentrifugeuse c'est-à-dire contenant environ trois fois leur poids d'eau.

Après quelques essais nous avons adopté le schéma d'extraction de CMELIK (72) selon lequel les bactéries humides sont

déshydratées dans un premier temps par emploi d'acétone à froid.

Nous n'avons apporté à cette technique qu'une très petite modification d'ordre pratique; l'auteur n'employait pas successivement l'alcool puis l'éther mais un mélange d'alcool-éther (trois parties pour une partie); évidemment dans un Kumagawa il n'était pas question d'employer un mélange de deux solvants présentant une telle différence de points d'ébullition, c'est pourquoi nous utilisons successivement chacun de ces deux solvants.

Voici donc le mode opératoire que nous avons suivi; les bactéries humides sont dès leur récolte immergées dans un assez grand volume d'acétone à température ordinaire. Après 24 heures d'immersion les bactéries recueillies par filtration sont introduites dans la cartouche d'un Kumagawa et soumises à l'action de l'acétone pendant six heures, de l'alcool absolu pendant deux heures (cette extraction par l'alcool absolu est répétée deux fois), de l'éther sulfurique pendant trois heures et finalement du chloroforme pendant six heures.

Dans une expérience partant de 88 g de colibacilles humides (correspondant à 23,35 g de bactéries sèches) nous avons vérifié que l'extraction des lipides est totale c'est-à-dire que la dernière fraction de solvant employé ne dissout pratiquement plus rien. Pour cela nous avons évaporé au bain-marie sous un courant de gaz carbonique le produit de chacun des épuisements et avons pesé le résidu.

Nous avons obtenu les résultats figurant dans le tableau suivant n° I.

Les chiffres obtenus montrent bien que l'extraction est

pratiquement totale puisque le dernier épuisement fournit un résidu égal à moins de I/5.000 de la prise d'essai.

Tableau I

Nature du solvant	Volume de solvant employé	Mode d'extraction	Durée de l'extraction	Poids en g de substance dissoute
Acétone	600 ml	macération à T° ordinaire.	24 h	0.424
Acétone	600 ml	Kumagawa	3 h	0.203
Alcool absolu	600 ml	Kumagawa	3 h	0.509
Alcool absolu	600 ml	Kumagawa	3 h	0.I78
Ether sulfurique	600 ml	Kumagawa	3 h	0.072
Chloroforma	600 ml	Kumagawa	6 h	0.029
Chloroforme	600 ml	Kumagawa	6 h	0.004

Le poids total de substances extraites est de I,4I9 g soit 6,06 g pour I00 g de bacilles secs.

En fait, l'extrait sec n'est pas constitué que de lipides; à la faveur de l'eau contenue dans les bactéries, se sont dissous (surtout dans l'acétone à froid) des sels minéraux et organiques, des glucides et des protides de faible poids moléculaire.

Or seuls les lipides vrais sont solubles dans le chloroforme. Il est donc nécessaire après évaporation des différents solvants de reprendre avec les précautions d'usage le résidu sec par environ I00 ml de chloroforme employés en plusieurs fois.

Cette solution chloroformique distillée sous gaz carboni-

que donne un résidu brun foncé solide, odorant qui n'est formé que de lipides vrais.

Dans l'exemple précédent, les différents solvants avaient extrait I,4I9 g; après reprise par du chloroforme et évaporation de celui-ci, le résidu n'est plus que de I,352 g correspondant à 5,8 g pour IOO g de bacilles secs.

II. SAPONIFICATION

Les méthodes de saponification des lipides sont très nombreuses: on peut opérer à chaud ou à froid, en milieu organique ou en milieu aqueux, en choisissant comme agent d'hydrolyse un acide ou une base. La potasse en solution alcoolique est un des meilleurs agents d'hydrolyse; les savons de potassium sont en effet solubles dans l'alcool et le milieu reste donc homogène pendant toute l'opération tandis que par exemple si on emploie la baryte les savons de baryum formés sont insolubles et peuvent, adsorbant des lipides, empêcher ainsi leur hydrolyse ultérieure.

Nous avons donc choisi comme agent d'hydrolyse la potasse préparée ainsi: 5 g de potasse (Merck) en bâtons sont dissous dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour obtenir un volume de 30 ml; après refroidissement le volume est complété à IOO ml par de l'alcool méthylique.

Des premiers essais effectués à froid nous ont montré que la saponification n'était pas complète, c'est pourquoi par la suite nous avons opéré à chaud.

Les lipides totaux sont saponifiés à reflux par 40 fois leur poids de potasse pendant 3 heures au bain-marie bouillant.

La plus grande partie de l'alcool est ensuite chassée sous gaz carbonique et le résidu, repris par un volume d'eau double de celui de la solution de potasse employée pour la saponification, est transvasé dans une ampoule à décantation. Après refroidissement, il est ajouté de l'acide chlorhydrique normal goutte à goutte jusqu'à pH8 vérifié au papier indicateur Merck. L'insaponifiable est ensuite extrait à cinq reprises par un volume d'éther sulfurique double de celui de la liqueur à épuiser (l'éther sulfurique employé est de l'éther anhydre et débarrassé de ses peroxydes par action du sodium, l'absence de peroxydes ayant été vérifiée par la réaction à la phénolphtaléine réduite).

Les solutions éthérées sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre puis évaporées sous vide partiel avec un lent courant de gaz carbonique.

On obtient ainsi un résidu jaune foncé, solide qui constitue l'insaponifiable.

III. CHROMATOGRAPHIE DE L'INSAPONIFIABLE

En plus des stérols, un insaponifiable contient toujours de nombreuses autres substances: alcools gras supérieurs, caroténoïdes et pigments, hydrocarbures autres que le carotène (squalène, etc...)

Chez Esch. coli le poids de stérols par rapport au poids d'insaponifiable total est particulièrement faible et une réaction de Liebermann effectuée directement sur la totalité de

l'insaponifiable n'aurait aucun sens.

La littérature indique que de nombreux auteurs pour doser les stérols dans un insaponifiable procèdent, avec des succès variables suivant les cas, à une chromatographie préalable; après un bref rappel de quelques généralités sur la chromatographie d'adsorption nous décrirons successivement plusieurs méthodes que nous avons mises en oeuvre.

La méthode d'analyse chromatographique par adsorption a été inventée par TSWETT en 1906 pour isoler à partir de la chlorophylle brute les différents pigments chlorophylliens. Après une assez longue période d'oubli elle est remise en honneur en 1931 par KUHN, LEDERER et WINSTERTEIN (73) qui l'appliquent à l'isolement des caroténoïdes. Actuellement la chromatographie fait partie des méthodes classiques d'analyse et est employée pour l'étude de groupements chimiques très divers.

"Restés longtemps obscurs les phénomènes d'adsorption sont apparus comme l'effet de charges électriques des atomes de l'adsorbant qui déterminent la captation des substances polaires en solution" (STOLL in GAUTIER II, page 90) (74).

Lorsqu'il s'agit de substances colorées ou fluorescentes en lumière ultra-violette on procède à la chromatographie par développement mais lorsqu'il s'agit (comme dans notre cas) de substances incolores, il faut utiliser la chromatographie par élution dont le principe est très simple: la substance à chromatographier mise en solution dans un solvant non polaire est versée sur une colonne contenant un agent adsorbant (l'adsorbant le plus utilisé est l'alumine). Par lavage de la colonne avec

une substance non polaire, on élue les corps non polaires (hydrocarbures) qui ne se fixent pratiquement pas. Les corps qui restent adsorbés sur la colonne le sont d'autant plus fortement que leur polarité est plus grande et ils nécessitent pour leur élution des solvants de polarité d'autant plus accentuée que la polarité du corps à éluer est elle-même plus grande.

Voici par ordre d'activité croissante d'élution la classification des solvants que nous avons employés soit purs, soit en mélange (selon TRAPPE dans MATHIEU, PETIT, POIRIER et VELLUZ (75)

- Ether de pétrole
- Benzène
- Chloroforme
- Ether sulfurique
- Acétone
- Méthanol

En utilisant des solvants de polarité croissante on parvient donc très facilement à fractionner l'insaponifiable.

" Très approximativement les substances riches en groupements hydrophiles se dissolvent dans les solvants polaires et les substances contenant surtout des groupements hydrophobes se dissolvent dans les solvants non polaires" (in VIGNERON, page I7) (76).

./..

A. TECHNIQUE DE LANGDON et BLOCH (77)

L'insaponifiable est repris par de l'éther de pétrole et passé sur une colonne d'alumine Merck. On élue d'abord les hydrocarbures par de l'éther de pétrole; les stérols sont ensuite élués par un mélange à parties égales d'acétone et d'éther sulfurique.

Nous avons essayé cette technique séduisante par sa simplicité. Les stérols se "décrochent" très facilement et passent en totalité dans les cinquante premiers millilitres d'éluat éther-acétone; mais en même temps passe une quantité importante de pigments et l'éluat obtenu, fortement coloré en jaune, est très impur. Il ne peut en particulier être question de faire directement sur lui une réaction de Liebermann. Donc malgré sa simplicité, cette méthode est peu satisfaisante pour nous.

B. TECHNIQUE DE CMELICK (78)

La chromatographie est faite sur colonne d'alumine Prolabo en employant successivement comme éluant de l'éther de pétrole, du benzène, de l'éther sulfurique et de l'alcool méthylique.

Voici le détail d'une opération :

On prépare avec les précautions d'usage une colonne d'alumine Prolabo dans de l'éther de pétrole, le poids d'alumine employé étant d'environ cinquante fois le poids d'insaponifiable à chromatographier.

L'insaponifiable, soit ici 80 mg., est dissous à chaud dans IO ml d'éther de pétrole, cette solution est versée sur la colonne d'alumine et l'on procède à l'élution en employant successivement :

- 25 ml d'éther de pétrole (Eb 40°-60°). Cette élution est répétée trois fois et l'on obtient ainsi les fractions I, II, III incolores mais fortement fluorescentes dans l'ultra-violet.
- 25 ml du mélange benzène-éther de pétrole (mélange à parties égales), cette élution est répétée 2 fois et l'on obtient ainsi les fractions IV et V qui sont légèrement colorées en jaune.
- 25 ml de benzène R.P. Cette élution est répétée 2 fois et l'on obtient les fractions VI. VII colorées en jaune.
- 25 ml du mélange benzène + éther sulfurique (mélange à parties égales) on obtient ainsi la fraction VIII colorée en jaune verdâtre.
- 25 ml d'éther sulfurique seul, on obtient ainsi la fraction IX colorée en jaune.
- 25 ml d'alcool méthylique R.P., on obtient ainsi la fraction X. La bande brune restée en surface pendant toute la chromatographie se décroche et colore l'éluat en jaune foncé; mais il convient de noter que les stérols sont toujours élués avant cette fraction.

Chaque fraction est évaporée à sec sous gaz carbonique. Une réaction de Liebermann faite séparément sur chacune d'elles, montre que, dans l'opération que nous décrivons,

ce sont les fractions VII (benzène seul) et IX (éther sulfurique) qui contiennent les stérols.

Cependant d'autres essais, réalisés dans les mêmes conditions, nous ont montré que les résultats ne sont pas reproductibles; si les stérols passent en général dans les fractions VI. VII. VIII, ce n'est pas une règle absolue; dans certains cas, on en trouve dès la fraction IV et jusqu'à la fraction IX.

Donc cette méthode n'est pas très satisfaisante dans notre cas et nous avons essayé de mettre au point une technique personnelle.

C. TECHNIQUE PERSONNELLE

La colonne d'alumine est préparée comme dans la technique de CHELICK mais l'élution est faite avec des solvants différents. On emploie comme éluants successifs d'abord de l'éther de pétrole, puis un mélange à parties égales d'éther de pétrole et de benzène, ensuite du benzène seul, un mélange benzène-alcool méthylique (95 parties pour 5 parties) et, pour terminer la chromatographie, de l'alcool méthylique pur.

Cette méthode présente un très gros inconvénient; sur trois essais que nous avons tentés, nous n'avons, dans deux cas, pu obtenir une élution totale des stérols avant la dernière fraction; or cette fraction est fortement colorée en jaune et ne peut donc fournir une réaction de Liebermann valable.

En résumé, des trois méthodes de chromatographie essayées, aucune ne nous a donné satisfaction car aucune ne nous a permis de localiser les stérols dans une fraction déterminée.

C'est pourquoi, dans la suite de nos expériences, lorsqu'il était possible d'effectuer directement le dosage des stérols sur l'insaponifiable total, en particulier par la méthode de SPERRY et WEBB, nous avons volontairement évité de procéder à une chromatographie.

IV. DOSAGE DES STEROLS

De nombreuses méthodes de dosage ont été proposées, nous les avons rappelées au chapitre II, mais pratiquement nous n'avons fait appel qu'à trois méthodes:dans la première, la réaction de Liebermann est effectuée sur un produit purifié, dans la deuxième cette réaction est effectuée sur le digitonide tandis que la troisième consiste dans la pesée de ce digitonide. Voici comment nous avons opéré dans chaque cas.

A. REACTION DE LIEBERMANN SUR L'INSAPONIFIABLE SEPARE PAR CHROMATOGRAPHIE

Il est nécessaire de procéder à une chromatographie avant de pratiquer une réaction de Liebermann car, si on effectue celle-ci sur l'insaponifiable brut, on obtient une coloration de teinte brun foncé absolument illisible et due à ce que l'addition d'acide sulfurique produit une carboni-

sation partielle.

Mode opératoire

Les divers éluats fournis par l'un quelconque des trois modes de chromatographie décrits ci-avant sont évaporés séparément sous un courant de gaz carbonique en évitant soigneusement les projections. Le résidu de chaque éluat est ensuite repris par 2,5 ml de chloroforme puis additionné de I ml de mélange acétylant préparé à l'avance de la façon suivante: I9 ml d'anhydride acétique préalablement refroidis dans la glace sont additionnés de I ml d'acide sulfurique pur et le mélange est refroidi. Les tubes sont placés à l'obscurité à 20° pour une durée de 30 minutes puis la lecture est faite au spectrophotomètre Coleman junior à 625 mμ par comparaison avec une courbe de référence préparée avec du cholestérol. Si plusieurs fractions différentes fournissent une réaction de Liebermann elles sont réunies. Il faut exprimer les résultats en se référant à un étalon ce qui est forcément arbitraire puisque les stérols de Esch. coli n'ont pas été isolés; nous avons choisi le cholestérol parce que les cinétiques des deux réactions de Liebermann, celle pratiquée avec le cholestérol et celle pratiquée avec le stérol isolé de Esch. coli, ne sont pas très différentes.

B. METHODE DE SPERRY-WEBB

La méthode que nous venons de décrire est obligatoirement précédée d'une chromatographie que nous ne sommes pas

arrivée à rendre rigoureusement reproductible; aussi dans la suite de nos dosages avons-nous préféré utiliser la méthode de SPERRY et WEBB (79) qui permet d'opérer le dosage sans chromatographie préalable.

Le principe en est le suivant: une solution contenant l'insaponifiable est additionnée d'une solution de digitonoside qui précipite le stérol sous forme de complexe; celui-ci est soigneusement lavé puis dissocié par la chaleur (II0°-II5° pendant 30 minutes au bain de sable). Finalement le stérol libéré est dosé par la réaction colorée de Liebermann.

Nous avons pu, à partir du complexe stérol-digitonoside obtenu à partir de Esch. coli et considéré comme étalon, préparer une gamme qui nous a servi de référence par la suite.

Etablissement de la gamme

5,53 mg de complexe stérol-digitonoside obtenu à partir de Esch. coli comme il sera dit ci-après sont portés à II5° pendant 30 minutes puis dissous dans 6,6 ml d'acide acétique R.P. On obtient ainsi une solution qui contient par ml 0,84 mg de complexe et qui va servir à préparer une gamme de référence.

Voici le mode opératoire tel que nous l'avons suivi: dans des tubes calibrés on répartit des quantités croissantes de la solution de complexe; on complète à 2 ml le volume de chaque tube par de l'acide acétique;on ajoute ensuite dans

chacun 4 ml d'un mélange acétylant (préparé comme il sera dit plus loin) puis les tubes sont agités et placés dans un bain-marie à 25°. Une étude cinétique de la coloration obtenue nous a montré qu'à 25° elle atteint son maximum vers 40 minutes et reste stable assez longtemps; c'est donc après un séjour de 45 minutes au bain-marie que la lecture est faite au spectrophotomètre à 625 mμ. Le tableau n° 2 résume le mode opératoire suivi et les résultats obtenus.

Tableau N° 2

N° des tubes	Solution de complexe en ml.	Acide acétique en ml.	Mélange acétylant en ml.	Teneur totale en complexe en μg	Densité optique à 625 mμ.
I	0	2	4	0	6
2	0,5	I,5	4	.420	I2,I
3	0,75	I,25	4	630	I5,5
4	I	I	4	840	I9
5	I,50	0,5	4	I260	26,I
6	2	0	4	I680	33,8

Ces résultats nous permettent d'établir un graphique (graphique n° I) qui nous montre que, du moins pour les faibles concentrations étudiées, la loi de Beer-Lambert est respectée.

./..

D.O

GRAPHIQUE N°I

Dosage du stérol isolé de Esch.coli par
la technique de SPERRY-WEBB
λ = 625 mμ

Dosage du stérol contenu dans l'insaponifiable de Esch. coli.

La précipitation est faite selon la technique indiquée dans la thèse de MATHIEU (80).

Dans un petit tube à centrifuger conique, l'insaponifiable (en moyenne IOO mg pour 5 g de colibacilles secs) est repris par 5 ml d'acétone puis additionné de I ml d'eau.

Ce tube est porté au bain-marie bouillant jusqu'à dissolution du résidu et en évitant avec soin les projections; puis la solution hydroacétonique est immédiatement additionnée de 0,45 ml de solution de digitonoside à 0,25% dans l'alcool absolu.

- Le tube est porté de nouveau au bain-marie bouillant jusqu'à début d'ébullition puis laissé au repos I6 à I8 heures afin que la précipitation soit totale. On obtient ainsi une solution colorée en jaune et qui contient en suspension de fins flocons blanchâtres.

Pour pratiquer le dosage colorimétrique selon SPERRY et WEBB, cette solution est centrifugée pendant I5 minutes à 6200 tours/minute aux environs de 0° dans une centrifugeuse réfrigérée (nous craignions en effet que l'emploi d'une centrifugeuse non réfrigérée par suite de l'élévation de température n'entraîne une légère solubilisation du complexe). Le liquide surnageant est jeté puis le précipité est lavé avec 5 ml d'un mélange formé d'une partie d'acétone pour deux parties d'éther sulfurique. Après une nouvelle centrifugation le précipité est lavé à deux reprises par 5 ml environ d'éther (à ce stade, le précipité peut être conservé

plusieurs jours). Au moment de développer la coloration, l'éther est chassé avec précaution par un séjour de quelques minutes dans un bain-marie d'eau tiède. Le développement de la coloration a lieu comme suit :

Le tube contenant le complexe est placé dans un bain de sable à II0-II5° pendant 30 minutes, ce qui a pour but de dissocier le complexe.

Après 30 minutes le bain de sable est retiré du four et 2 ml d'acide acétique glacial exactement mesurés, sont versés sur le précipité (toujours en laissant le tube dans le sable chaud). On agite jusqu'à dissolution complète du précipité, puis le tube est retiré du bain de sable et après refroidissement il est placé à l'obscurité dans un bain d'eau maintenue à 25°.

D'autre part, une quantité suffisante d'anhydride acétique est refroidie dans la glace, additionnée (toujours dans la glace) d'acide sulfurique (I ml pour 20 ml d'anhydride acétique). Quand ce mélange acétylant est complètement froid, le tube contenant la solution acétique de complexe est sorti du bain d'eau, additionné de 4 ml de mélange froid, agité, bouché et remis dans le bain à 25°.

Après un séjour de 45 minutes, la lecture est faite au spectrophotomètre Coleman junior.

On se reporte ensuite à la courbe de référence construite à partir du complexe isolé de Esch. coli

./..

C. METHODE DE WINDAUS-CAMINADE

Cette méthode donnée par CAMINADE (8I) ne nous a pas semblé intéressante lorsqu'il s'agissait de traiter de faibles quantités d'Esch.coli. En effet, elle est longue, fastidieuse et lorsque le poids de complexe à peser est très faible, ce qui aurait été souvent notre cas, la pesée est fort délicate. Par contre, nous avons employé cette technique lorsqu'il s'agissait de fortes prises d'essai; dans ce cas, les pesées à effectuer sont en effet au moins de l'ordre de quelques milligrammes, d'autre part le complexe peut être récupéré et sa décomposition ultérieure nous a permis l'étude du stérol.

Mode opératoire

La précipitation des stérols et leur dosage se font selon la technique de CAMINADE décrite par MATHIEU (82) en adaptant naturellement la quantité de solvants à la quantité présumée de stérols à doser. La quantité de précipité obtenue est toujours faible et difficile à récupérer sans trop de pertes lorsqu'on envisage de le décomposer pour en isoler le stérol. SCHWENK (83) dans des expériences qu'il a faites sur des levures, augmente le volume du précipité en le recueillant sur un filtre en verre fritté recouvert préalablement d'une petite couche de terre d'infusoires. Disposant au laboratoire d'hyflo-supercel (terre d'infusoires très pure) nous avons employé cette méthode: l'hyflo-super-

cel est desséché à IIO° jusqu'à poids constant et IOO mg environ sont versés sur un filtre à tarer G4. Ce filtre est mis une heure à IIO°, refroidi sous dessiccateur et pesé.

Le précipité est recueilli en s'aidant d'un agitateur fin sur un creuset pyrex en verre fritté G4 préalablement séché et taré. Le récipient où a eu lieu la précipitation est lavé 4 fois à l'eau bouillante, une fois avec le solvant E.A.C. de Caminade (acétone 73 parties; eau I8 parties; alcool absolu 9 parties) et une fois avec un mélange de 2 volumes d'éther pour I volume d'acétone; les quantités employées de chacun de ces solvants étant sensiblement égales au volume de solvants utilisé au cours de la précipitation; ces différents liquides sont chaque fois versés sur le creuset immédiatement après que la filtration du précédent soit achevée. Le creuset est séché 30 minutes à IOO-IIO°, refroidi une heure dans un dessiccateur puis pesé.

Le coefficient de conversion indiqué par WINDAUS (84) pour transformer le poids de complexe cholestérol-digitonoside en cholestérol est de 0,245. Pour les autres stérols ce coefficient varie mais légèrement, nous avons donc adopté arbitrairement un coefficient moyen de 0,25.

Avant d'employer cette méthode, nous avons vérifié sur des solutions de cholestérol qu'elle nous donnait des résultats corrects.

Des premiers essais ont été faits sans saponification: nous partions d'une solution chloroformique de cholestérol telle que I ml de solution contienne 3 mg de stérol. I ml de

cette solution est évaporé dans un petit bécher sous gaz carbonique, le résidu est repris par 25 ml d'acétone + 2,5 ml d'eau + 2,25 ml de solution de digitonoside à 0,5% (dans l'alcool absolu).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau N°3.

Tableau N° 3

Prise d'essai en mg.	Poids de complexe pesé en mg	Poids de cholestérol retrouvé en mg
3	I2,34	3,00
3	I2,47	3,03
3	I2,57	3,05
3	I2,65	3,07

Dans une autre série d'essais, nous avons vérifié que la saponification n'entraîne pas de pertes.

5 ml de solution de cholestérol à 300 mg p. I00 ml. (soit I5 mg de cholestérol) sont évaporés au bain-marie sous un courant de gaz carbonique et en évitant soigneusement les projections. Le résidu est repris par 30 ml de potasse à I8% dans l'alcool méthylique à 70% et on laisse en contact 24 heures à froid avec agitation. La majeure partie de l'alcool est ensuite évaporée sous gaz carbonique et 30 ml d'eau sont ajoutés au résidu, puis la solution obtenue est neutralisée par de l'acide chlorhydrique pur dilué au demi jusqu'à pH 8 vérifié au papier indicateur Merck. L'extraction est faite au moyen d'éther sulfurique (5 épuisements successifs

de IOO ml chaque fois). Après évaporation de l'éther, le résidu est repris par du chloroforme; cette solution chloroformique est recueillie dans un ballon jaugé de 50 ml et complétée au trait de jauge. Sur 4 portions aliquotes de 5 ml on procède à la précipitation par le digitonoside et à la pesée comme il a été dit auparavant.

Le tableau N° 4 résume les résultats obtenus

Tableau N° 4

Prise d'essai en mg.	Poids de complexe pesé. en mg.	Poids de cholestérol retrouvé en mg.
I,5	6,I6	I,50
I,5	6,I6	I,50
I,5	6,37	I,55
I,5	6,44	I,56

La méthode a donc donné dans nos mains des résultats satisfaisants.

V. RESULTATS EXPERIMENTAUX

Après bien des essais préliminaires nous avons pratiqué I8 dosages sur des récoltes différentes de Esch. coli; les unes provenant de cultures en ballons, les autres de cultures dans l'incubateur décrit page 26 .

Tous nos essais ont été positifs et ont donné des résultats d'un même ordre de grandeur. Ces résultats qui ont déjà fait l'objet de deux brèves communications [DAUCHY, KAYSER et VILLOUTREIX (85), DAUCHY et KAYSER (86)] sont ré-

sumés dans le tableau N° 5 où ils ont été groupés, non chronologiquement mais suivant la méthode de dosage employée; dans chaque groupe les chiffres obtenus sont classés par ordre croissant de poids de microorganismes mis en oeuvre.

Tableau N° 5

1. REACTION DE LIEBERMANN SUR L'INSAPONIFIABLE SEPARE PAR CHROMATOGRAPHIE.

Nombre de litres de milieu		I2	I2	24
Poids de bacilles secs en g.		5,23	5,26	I0,53
Lipides totaux en g.	dans l'échantillon	0,324	0,370	0,508
	pour I00 g de bacilles secs	6,I9	7,04	4,90
Stérols en mg dans l'échantillon		0,245	0,205	0,520
Stérols en mg pour I00 g de bacilles secs.		4,7	3,8	5,0

3. METHODE DE SPERRY-WEBB

Nombre de litres de milieu		5	5	5	I0	I0
Poids de bacilles secs en g.		2,05	2,I0	2,35	5,62	5,70
Lipides totaux en g.	dans l'échantillon	0,I48	0,I8I	0,I57	0,348	0,359
	pour I00 g de bacilles secs	7,22	8,6	6,76	6,I8	6,30
Complexe en mg dans l'échantillon		0,33	0,46	0,32	I,48	I,I0
Stérols en mg pour I00 g		4	5,5	3,4	6,6	4,8

C. METHODE DE WINDAUS CAMINADE

Nombre de litres de milieu		I2	48	74	I48	240
Poids de bacilles secs en g.		5,66	23,I	38	62,2	I04,8
Lipides totaux en g.	dans l'échantillon	0,357	I,009	3,32	5,0I3	8,530
	pour I00 g de bacilles secs	6,3I	4,26	8,73	8,06	8,I4
Complexe en mg dans l'échantillon		I,68	3,25	9,93	I2,29	27,68
Stérols en mg pour I00 g de bacilles secs.		7,5	3,5	6,5	4,9	6,6

Nombre de littres de milieu		250	250	350	360	550
Poids de bacilles secs en g.		I23,5	I27,I	I40,3	I67,5	283,3
Lipides totaux en g.	dans l'échantillon	9,242	9,5I6	I0,253	II,35	I7,936
	pour I00 g de bacilles secs	7,49	7,48	7,30	6,77	6,33
Complexe en mg dans l'échantillon		I5,24	32,04	34,76	29,38	47,68
Stérols en mg pour I00 g de bacilles		3	6,3	6,2	4,4	4,2

Du tableau N° 5 il résulte que la moyenne arithmétique des teneurs de Esch. coli en stérols est d'environ 5 mg pour 100 g de bacilles secs.

Cette valeur moyenne n'est pas une constante d'espèce car la distribution des résultats n'est absolument pas gaussienne, aussi le calcul d'une "standard déviation" ou d'une variance serait-il un non sens. Ce résultat n'est pas surprenant, la teneur en stérols pouvant dépendre d'un grand nombre de facteurs que nous n'avons pas étudiés et en particulier de l'âge physiologique des bactéries.

Nous avions la hantise, lorsque nous avons entrepris ces expériences, que les résultats positifs que nous obtenions ne scient dus à des souillures involontaires provenant des réactifs, des conditions de culture ou des manipulations; ces petites quantités de stérols que nous mettions en évidence n'étaient-elles pas en quelque sorte des artefacts? Nous avons proscrit les bouchons de liège ou de coton, nous avons vérifié que les réactifs étaient bien exempts de stérols. Si nos doigts avaient apporté des stérols, comme cela a été suggéré quelquefois, la quantité de stérols retrouvée serait proportionnelle au nombre de manipulations effectuées; or, pour une opération ne portant que sur 5 g de bacilles secs, le nombre de manipulations effectué est le même que lorsqu'il s'agit de traiter 50 g de bacilles; s'il s'agissait d'une pollution la quantité de stérols trouvée devrait donc rester la même au lieu d'être proportionnelle à la quantité de bacilles mis en oeuvre.

Mais, en dehors de ces preuves que l'on pourrait appeler négatives, nous pensons que le tableau N°5 apporte des éléments positifs en faveur de l'existence chez Esch. coli de corps ayant les propriétés des stérols. En effet,

I°) les volumes de milieux de culture utilisés varient de 5 à 550 l soit dans la proportion de I à II0, les poids de la récolte bactérienne varient de 2,05 à 283,3 g soit dans la proportion de I à I40 et cependant la concentration en stérols, rapportée à I00 g de bactéries, ne varie que de 3,0 à 7,5 mg soit dans le rapport de I à 2,5.

2°) aux fortes prises d'essai correspondent aussi bien des teneurs en stérols faibles qu'élevées. Ainsi une prise d'essai de I23,7 g d'Esch. coli secs contient 3,0 mg de stérol pour I00 g, tandis qu'une autre prise d'essai pesant I40,3 g et traitée exactement dans les mêmes conditions a une teneur en stérols sensiblement double de la précédente: 6,2 mg (au lieu de 3,0 mg).

3°) de même aux faibles prises d'essai correspondent à la fois des teneurs en stérols faibles ou élevées. Ainsi une prise d'essai de 2,35 g de colibacilles secs contient 3,4 mg de stérols alors qu'une prise d'essai de I,62 g en renferme 7,5 mg soit plus du double.

En résumé, objectivement, nous pensons avoir évité au cours de nos manipulations tout apport extérieur de stérols. - ceci est confirmé par le fait que la teneur en stérols n'est pas en rapport avec la quantité de milieux de culture ou de solvants utilisés ni avec le poids de bactéries mis en

oeuvre.

- Enfin le fait que dans toutes nos expériences la teneur en stérols soit restée dans les limites assez étroites (3 à $7,5.10^{-5}$) semble exclure les souillures.

Cet ensemble de raisons nous permet de conclure que Esch. coli contient environ 5.10^{-5} de son poids sec de corps donnant les réactions habituelles des stérols et dont l'étude, aux fins d'identification, fait l'objet du chapitre suivant.

o
o o

- C H A P I T R E V -

ETUDE DU "STEROL" ISOLE DE ESCHERICHIA COLI

-

Nous avons donc isolé de l'insaponifiable de Esch. coli un produit fournissant la réaction de Liebermann et donnant un digitonide insoluble; il est légitime de penser que ce corps peut être un stérol. C'est pourquoi nous avons tenté une identification de ce produit.

Le produit à étudier est isolé sous forme d'un complexe avec le digitonoside qu'il nous a donc fallu d'abord décomposer. Quoique le complexe stérol digitonoside soit stable, il existe cependant plusieurs méthodes qui permettent de le dissocier. Nous citerons:

- l'action de la chaleur à II0°-II5° pendant 30 minutes décrite par SPERRY et WEBB (87).
- la distillation à 240° sous vide proposée par BLOOR (88)
- le xylol bouillant employé par WINDAUS (89)
- la pyridine à l'ébullition utilisée par SCHOENHEIMER et DAM (90); celle-ci solubilise les deux constituants du complexe, par addition d'éther sulfurique on précipite ensuite le digitonoside et le stérol libéré reste en solution.

Cette dernière technique est employée par de nombreux auteurs lorsqu'ils veulent récupérer un stérol engagé dans un digitonide et nous l'avons également adoptée.

Pour 4,4 g de complexe cholestérol digitonoside, SCHOENHEIMER et DAM emploient 25 ml de pyridine soit un volume de pyridine qui correspond à 5 fois le poids du complexe; nous ne pouvions conserver ces mêmes proportions: en effet, comme

nous avons travaillé sur des quantités de complexe allant de IO à 40 mg il nous aurait fallu employer des fractions de ml de pyridine; nous avons donc augmenté proportionnellement la quantité de pyridine.

Le complexe est repris par de la pyridine à l'ébullition (pyridine redistillée) en quantité suffisante. Après refroidissement, la solution obtenue (s'il s'agit de complexe seul) la suspension (s'il s'agit de complexe + hyflosupercel) est additionnée de IO volumes d'éther sulfurique qui précipite le digitonoside. Le digitonoside et le digitonide non décomposé sont ensuite retenus par filtration sur verre fritté G4; le mélange d'éther sulfurique et de pyridine recueilli contient le stérol en solution.

La décomposition n'est pas totale d'emblée, il faut donc la répéter. Le précipité résiduel est donc repris par de l'alcool à 85° qui solubilise le digitonoside; finalement ne reste comme insoluble que le complexe qui a échappé à l'action de la pyridine. On fait subir à ce complexe une nouvelle décomposition dans les mêmes conditions que précédemment.

Les deux solutions éthéro pyridiniques sont ensuite réunies; les solvants sont évaporés au bain-marie sous vide partiel avec un lent courant de gaz carbonique pour éviter les oxydations (l'évaporation de la pyridine étant assez longue à obtenir l'on observe toujours malgré ces précautions un léger brunissement).

Le résidu obtenu est jaune et huileux. Ce résidu est

dissous dans la plus petite quantité possible, (environ 3 ml) d'alcool méthylique à une température voisine de 40°. La solution limpide est décantée et abandonnée plusieurs jours au froid jusqu'à apparition de cristaux blancs.

Sur ces cristaux nous avons pratiqué différents essais que nous allons rapporter et discuter.

I. Point de fusion
II. Analyse élémentaire
III. Etude critique de la réaction de Liebermann.
IV. Formation d'un complexe avec le digitonoside.
V. Spectre d'absorption dans l'ultraviolet.
VI. Spectre d'absorption en solution sulfurique.
VII. Spectre d'absorption dans l'infrarouge.
VIII. Spectre de diffraction par les rayons X.

I. POINT DE FUSION

Le point de fusion a été pris au microscope de Kofler. Il a fallu 5 recristallisations successives dans le méthanol pur R. P. pour obtenir un corps présentant un point de fusion constant.

Le résidu de la première cristallisation se présente au microscope polarisant comme une gangue amorphe englobant quelques petits cristaux et la fusion de ce corps débute à 58° pour être totale vers 74°.

Après 5 recristallisations on obtient un corps assez bien cristallisé de point de fusion constant= I32-I34°.

Certes les points de fusion des stérols sont très variables: ainsi EVANS (9I) cite l'épiallocholestérol dont le point de fusion n'est que de 84° alors que le cerevistérol d'après HONEYWELL (92) fond à 265,3°. Cependant pour POLONOWSKI (93) les points de fusion des stérols oscillent généralement entre I02 et I70°.

II. ANALYSE ELEMENTAIRE

Elle a été faite pour nous au laboratoire municipal de Paris (que nous remercions de son obligeance) sur ce

corps de point de fusion: I32-I34° et donne les résultats suivants:

C = 8I,82 %

H = I2,50 %

Si on calcule la formule centésimale de quelques stérols connus, on trouve:

- cholestérol	C = 83,94 %	H = II,92 %
- stigmastérol	C = 84,46 %	H = II,65 %
- sitostérol	C = 84,05 %	H = I2,08 %

Nous ne disposions malheureusement que d'une très petite quantité de produit à analyser; de ce fait les résultats de la microanalyse qui a porté sur I,52 mg n'ont qu'une valeur relative. Cependant une chose est indiscutable: les pourcentages respectifs de carbone et d'hydrogène dans notre corps sont très voisins de ceux d'autres stérols.

III. ETUDE CRITIQUE DE LA REACTION DE LIEBERMANN FOURNIE PAR LE STEROL ISOLE DE ESCH. COLI

Nous avons déjà indiqué dans le chapitre précédent que le corps que nous avons isolé de Esch. Coli fournit une réaction de Liebermann positive.

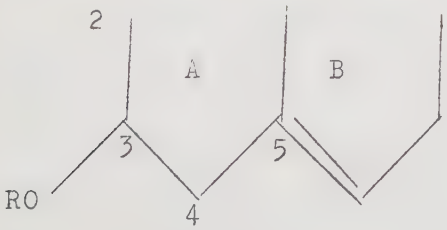
Avant tout un point est à préciser: il est classique de dire [in GILMAN II, p. I390 (94] que les réactions colorées données par les stérols ne permettent qu'une identification préliminaire et une analyse quantitative mais ne sont pas spécifiques.

Dans le cas de la réaction de Liebermann il est bien connu que des corps ayant des formules très différentes du cholestérol donnent également une réaction positive, c'est le cas par exemple du furanne et du thiophène. Or le furanne et le thiophène sont tous deux des liquides et l'analyse élémentaire de ces composés donne respectivement le pourcentage suivant : C = 70,59%, H = 23,53% et C = 57,I4%, H = 5,88%

MEUNIER et VINET (95) en I947 dans un ouvrage consacré à la mésomérie approfondissent le mécanisme de la réaction de Liebermann; ils rappellent les travaux de ECK et THOMAS (96) qui, en I939, étudiant l'action de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique sur les stérols montrent que seuls peuvent donner des dérivés antirachitiques les corps de structure cyclopentano perhydrophénanthrénique qui possèdent une double liaison en 4-5 avec ou sans double liaison additionnelle, avec ou sans groupement OH et sans groupement cétonique en 3 ou 7.

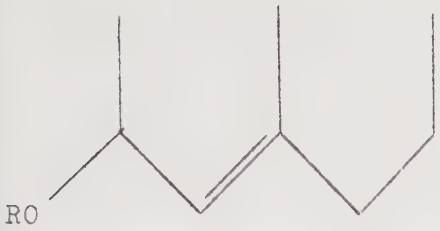
Or ces stérols ainsi "activables" sont ceux qui donnent une réaction de Liebermann positive.

D'après ces auteurs le corps que nous avons isolé présenterait donc une des structures suivantes où le carbone 5 est engagé dans une double liaison.



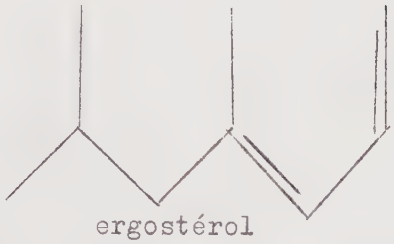
Cholestérol

Cholestène



Allo-cholestérol

Cholestérylène



ergostérol

Pour PESEZ et POIRIER (97) la réaction de Liebermann impose la présence d'une chaîne liée au cycle D en I7, la coloration verte ne se développant que si la chaîne comporte au moins 2 carbones.

Récemment VELLUZ, GOFFINET, WARNAN et AMIARD (98) puis PESEZ (99) montrent que les nor I9 stéroïdes conduisent à une réaction négative; il apparaît donc une nouvelle exigence: celle du méthyle angulaire.

Ces deux dernières opinions montrent qu'il ne faut pas accorder aux conclusions de MEUNIER une valeur trop absolue et ne pas assigner forcément au stérol isolé de Esch. coli une des 5 structures qu'il propose.

L'étude approfondie de la réaction de Liebermann peut fournir d'autres renseignements de valeur. Cette réaction évoluant en fonction du temps de façon différente suivant le stérol étudié la cinétique de la réaction mérite d'être étudiée.

Etude cinétique de la réaction de Liebermann

Cette étude a été menée parallèlement sur le stérol isolé de Esch. coli et sur 4 stérols connus: cholestérol (Roche), stigmastérol (Roche), sitostérol (Roche) et ergostérol (Roussel).

a) Cinétique de la réaction de Liebermann effectuée selon SCHOENHEIMER-SPERRY (IOO)

2 ml de solution de stérol dans l'acide acétique glacial sont additionnés, en agitant, de 4,2 ml de mélange acétylant préparé au préalable de la façon suivante: à I9 ml d'anhydride acétique préalablement refroidis est ajouté, toujours dans la glace, I ml d'acide sulfurique.

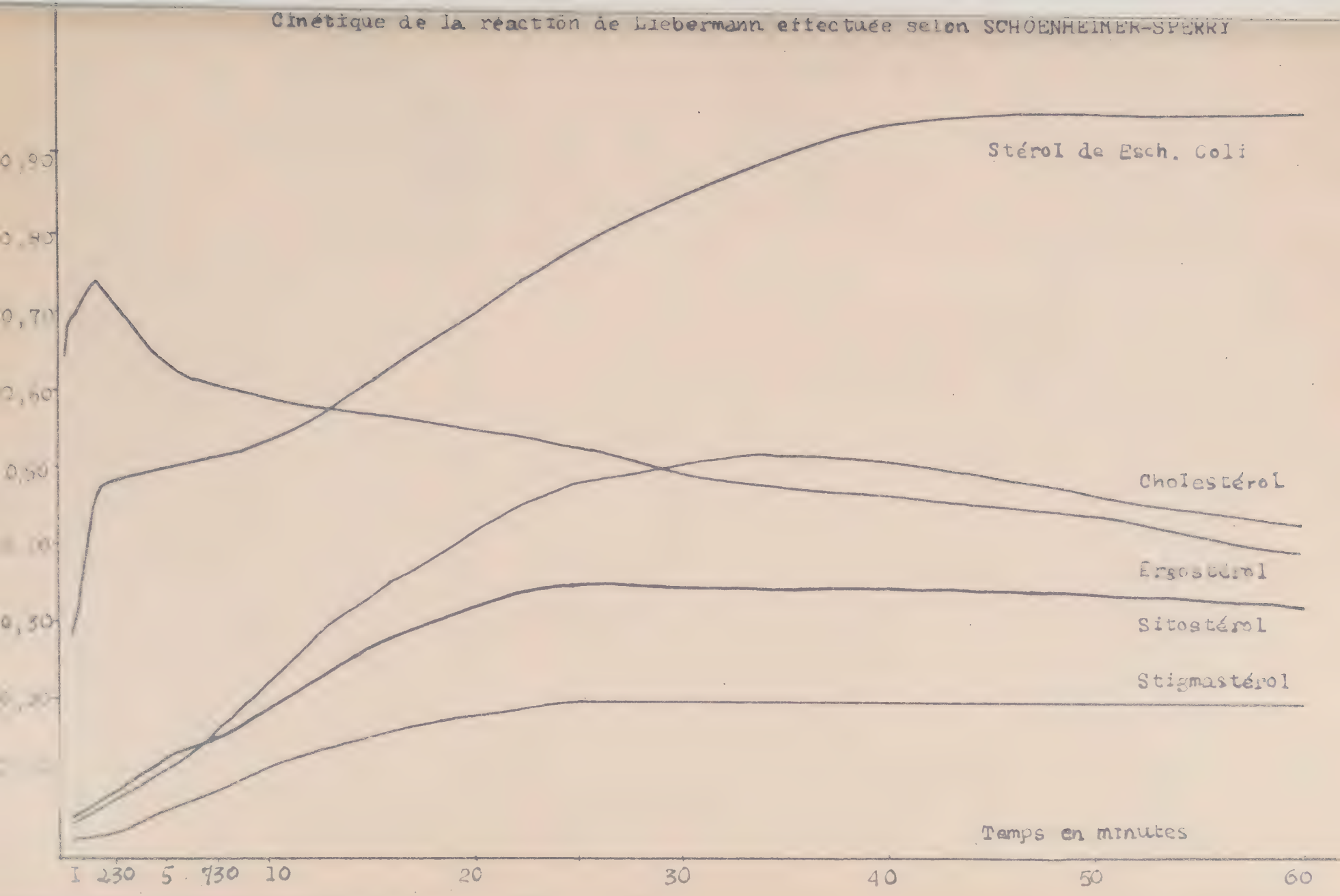
Le tube est mis au bain-marie à 25° dans une chambre noire et des lectures sont faites, au spectrophotomètre Coleman junior, à 625 mμ , à des temps bien déterminés.

La courbe tracée en portant en abcisses le temps et en ordonnées les densités optiques correspondantes traduit l'évolution cinétique de la réaction (graphique 2).

De l'examen de ces courbes, il ressort l'évidence d'ailleurs connue depuis longtemps, qu'il existe entre la cinétique de la réaction du cholestérol et celle de l'ergostérol une très grande différence.

Cette différence de réactivité des stérols vis à vis du réactif de Liebermann a été étudiée en I953 par IDDLER et BAUMANN (IOI). Ces auteurs comparent I9 stérols et montrent que les stérols possédant 2 doubles liaisons conjuguées réa-

Cinétique de la réaction de Liebermann effectuée selon SCHOENHEIMER-SPERRY



gissent très rapidement (fast acting sterols) alors que ceux ne possédant qu'une seule double liaison réagissent beaucoup plus lentement; enfin les stérols possédant 2 doubles liaisons non conjuguées, l'une en 5, l'autre en 8-9, 8-I4 ou I4-I5 sont intermédiaires.

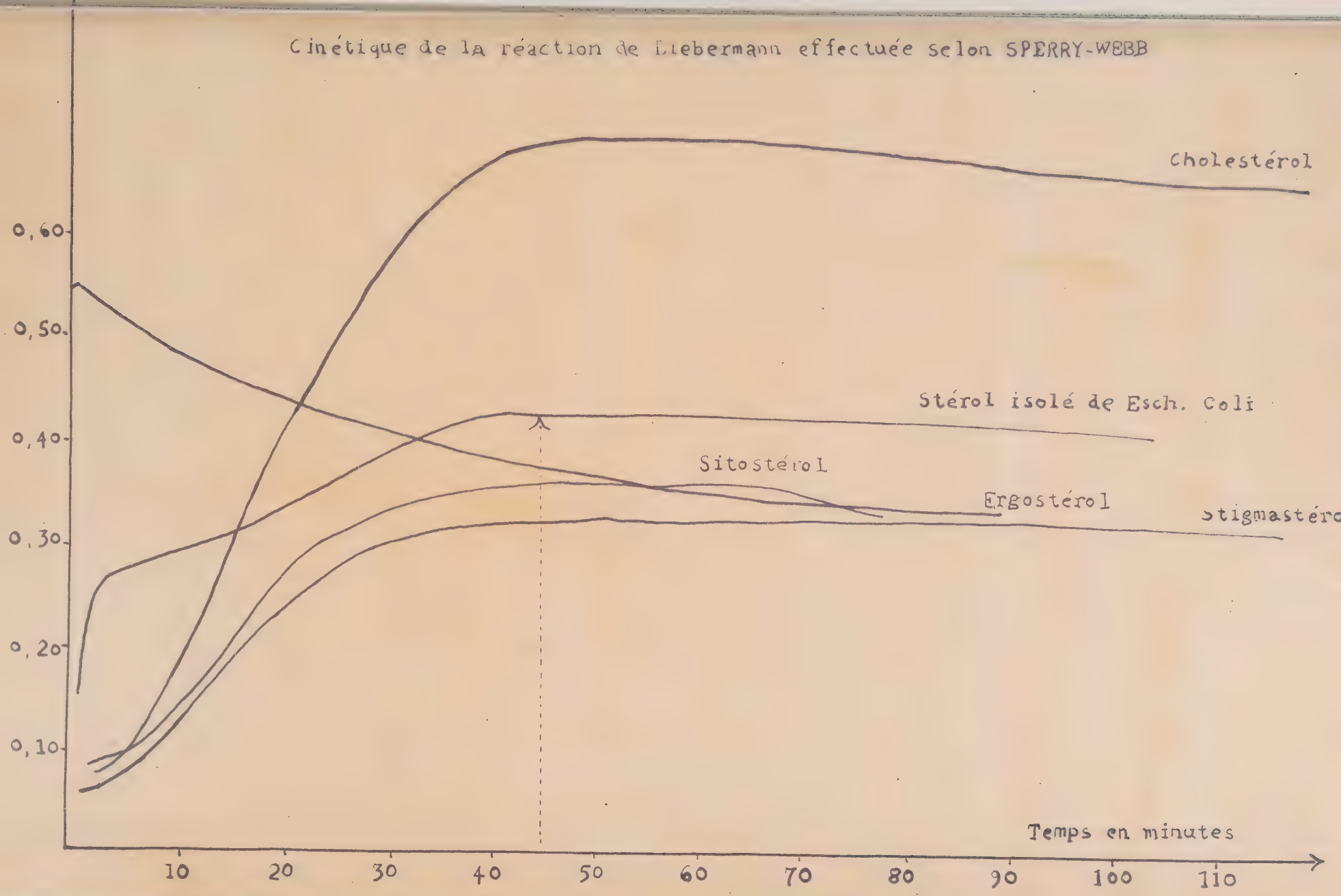
L'examen des courbes que nous avons obtenues montre bien que l'ergostérol fournit une réaction très rapide tandis que le cholestérol, le sitostérol et le stigmastérol donnent une réaction lente. La cinétique du stérol de Esch. coli semble assez spéciale. Après une augmentation rapide de la densité optique, la courbe présente un point d'inflexion assez net, puis son allure est ensuite voisine de celle du cholestérol. (Nous devons signaler que les quantités de stérols ne sont pas exactement les mêmes dans les différents cas. Il s'en suit que les ordonnées des courbes n'ont pas de valeur absolue et que seule compte leur allure générale).

b) Cinétique de la réaction de Liebermann effectuée selon SPERRY et WEBB (I02)

Nous avons répété ces expériences en opérant cette fois selon la technique de SPERRY-WEBB c'est-à-dire sur le composé stérol-digitonoside.

Les courbes présentent exactement la même allure que celles obtenues précédemment par la technique de SCHOENHEIMER

En conclusion: le stérol isolé de Esch. coli ne peut être classé ni dans les stérols "rapides" ni dans les stérols


Cinétique de la réaction de Liebermann effectuée selon SPERRY-WEBB
Cholestérol
Stérol isolé de Esch. Coli
Sitostérol
Ergostérol
Stigmastéro
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
Temps en minutes
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110

"lents"; on pourrait penser qu'il s'agit d'un mélange de 2 stérols, l'un rapide, l'autre lent mais aucune autre donnée ne permet pour l'instant de justifier cette hypothèse.

Courbes d'absorption des colorations obtenues

Les lectures ont été faites sur les colorations obtenues d'une part suivant la technique de SCHOENHEIMER-SPERRY d'autre part suivant celle de SPERRY- WEBB.

Pour chacun des stérols précédemment étudiés il faut effectuer les lectures à un moment où la coloration paraît être stable; une étude préliminaire de la cinétique de la réaction nous a montré pour chaque stérol le moment optimum de lecture.

Pour effectuer ces mesures nous avons employé le spectrophotomètre Coleman car il est d'un maniement rapide. Le tableau N°6 indique à quel moment ont été faites les lectures pour chacun des stérols étudiés.

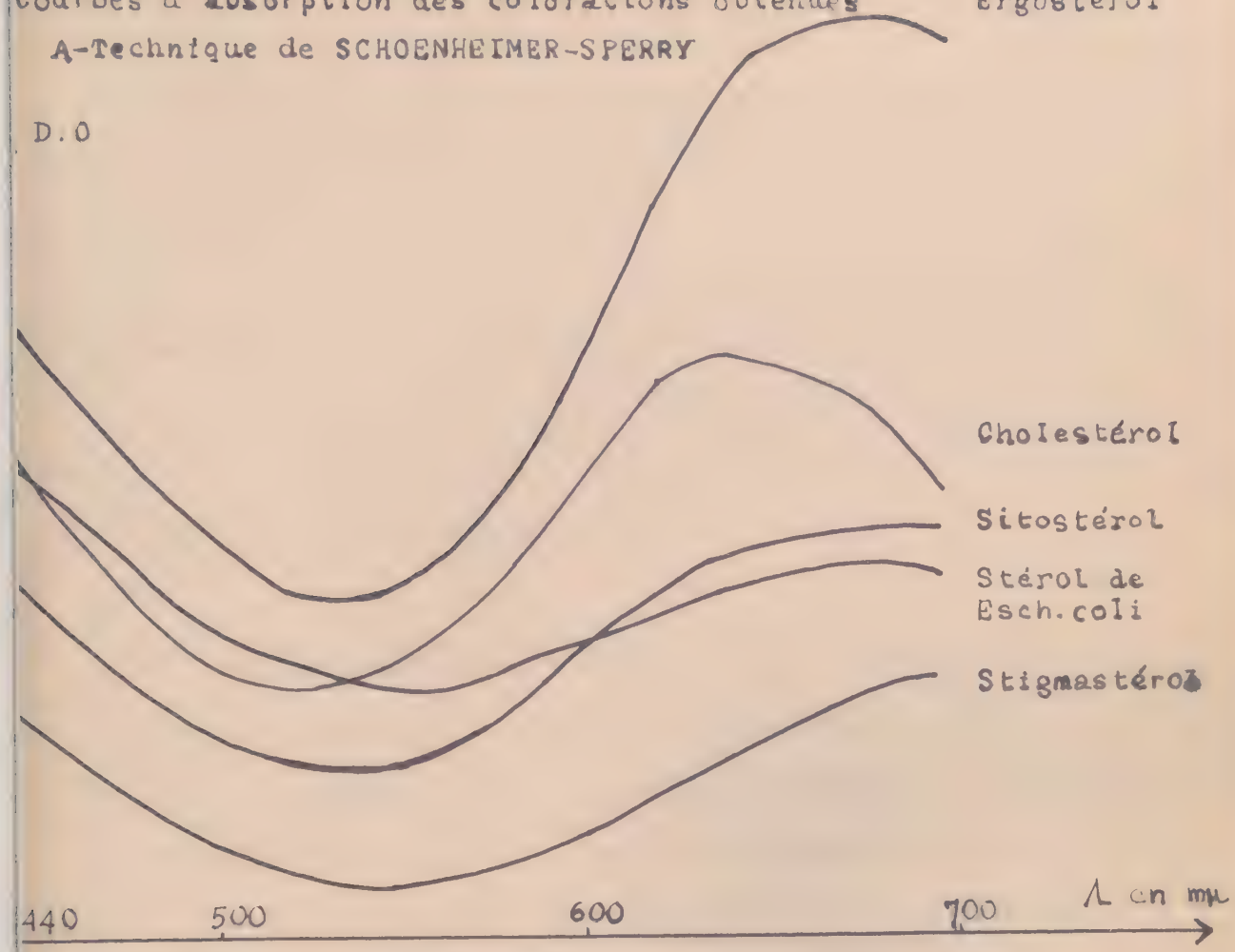
Tableau N°6

	Méthode de SCHOENHEIMER SPERRY.	Méthode de SPERRY WEBBE.
Ergostérol	IO minutes	6 minutes
Cholestérol	30 minutes	45 minutes
Sitostérol	25 minutes	50 minutes
Stigmastérol	45 minutes	50 minutes
stérol isolé de Esch. coli	50 minutes	45 minutes

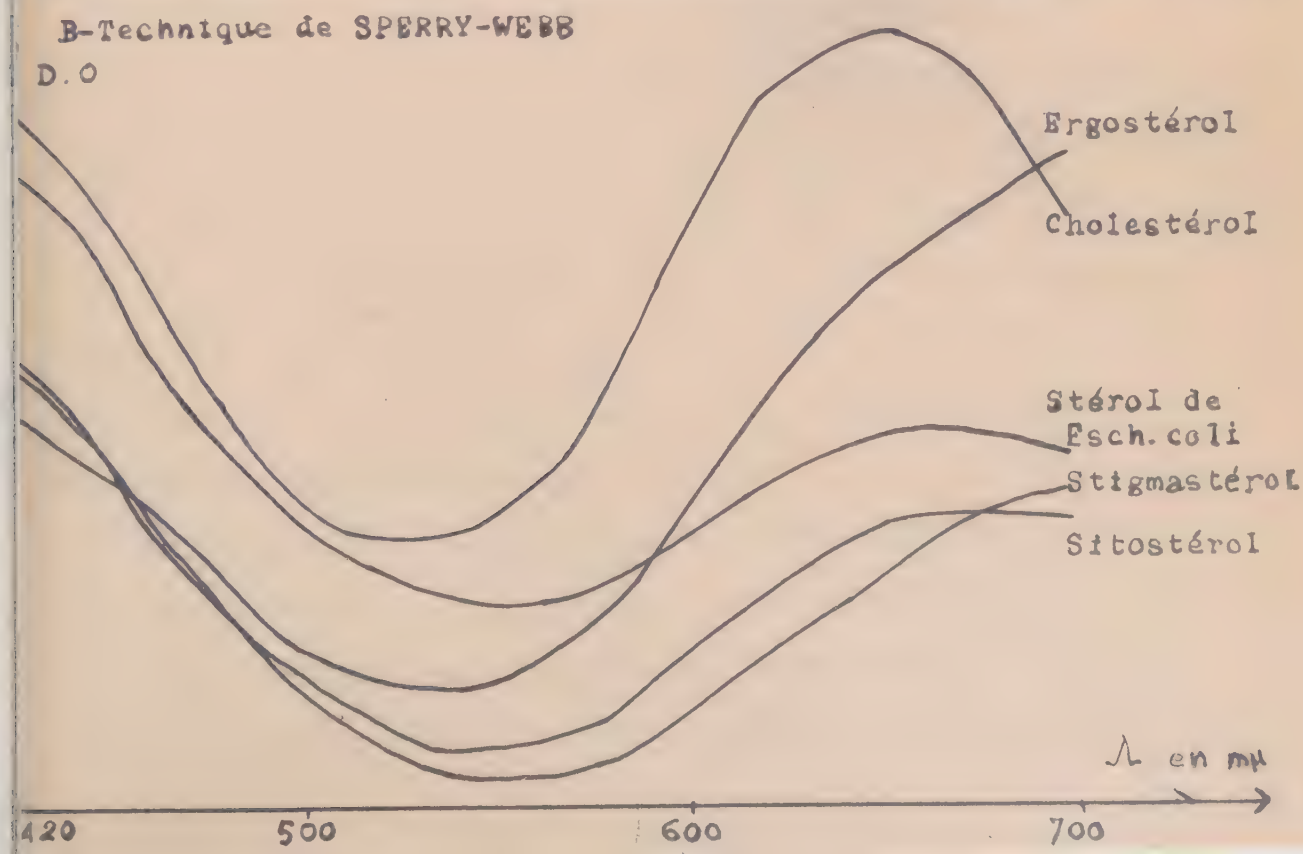
GRAPHIQUE N°4

Courbes d'absorption des colorations obtenues

A-Technique de SCHOENHEIMER-SPERRY



B-Technique de SPERRY-WEBB



L'examen des différents spectres obtenus (Graphique n°4A pour la méthode de SCHOENHEIMER - SPERRY et B pour la méthode de SPERRY-WEBB) nous permet simplement de constater qu'ils ont tous exactement la même allure générale en particulier un minimum d'absorption aux environs de 540 mμ . Donc, qu'il soit libre ou sous forme de complexe, le stérol isolé de Esch. coli fournit une réaction de Liebermann voisine de celles données par des stérols connus.

IV. FORMATION D'UN COMPLEXE AVEC LE DIGITONOSIDE

Outre les stérols, d'autres corps peuvent également donner avec le digitonoside des complexes d'addition moléculaire.

CHEVALIER (I03) cite le butanol, l'alcool amylique, le phénol, le thiophénol, l'αnaphtol, les d et l αterpinol, le tétrahydro-βnaphtol, le chlorobromofluorométhane.

Le corps que nous avons isolé par précipitation avec le digitonoside est un composé solide, donnant une réaction de Liebermann positive et dont la composition centésimale est tout à fait comparable à celle des stérols; il est donc légitime de penser qu'il ne s'agit pas d'un alcool-phénol ou d'un thiophénol mais bien d'un corps de structure cyclopentanoperhydrophénanthrénique.

On sait depuis longtemps qu'il faut un OH libre en 3 pour obtenir avec le digitonoside un complexe. WINDAUS (I04) puis FERNHOLZ (I05) ont insisté sur l'importance de la position stérique de cet OH : seuls précipitent les stérols qui

présentent I OH transoïde.

En 1946, VELLUZ, PETIT et PESEZ (106) ont montré que si les stéroïdes saturés ou non saturés possédant en position 3 un OH transoïde libre fournissent avec le digitonoside un complexe insoluble, les 3 cétostéroïdes saturés en 4-5 et sans OH libre fournissent également des digitonides insolubles (la formation du complexe étant ici plus lente).

Par contre les cétostéroïdes carbonylés en 3 et non saturés en 4-5 ne conduisent plus à la formation avec le digitonoside de complexes insolubles.

Donc puisqu'il précipite par le digitonoside, le corps que nous avons isolé de Esch. coli peut présenter, d'après VELLUZ, 2 structures différentes. Il peut s'agir:

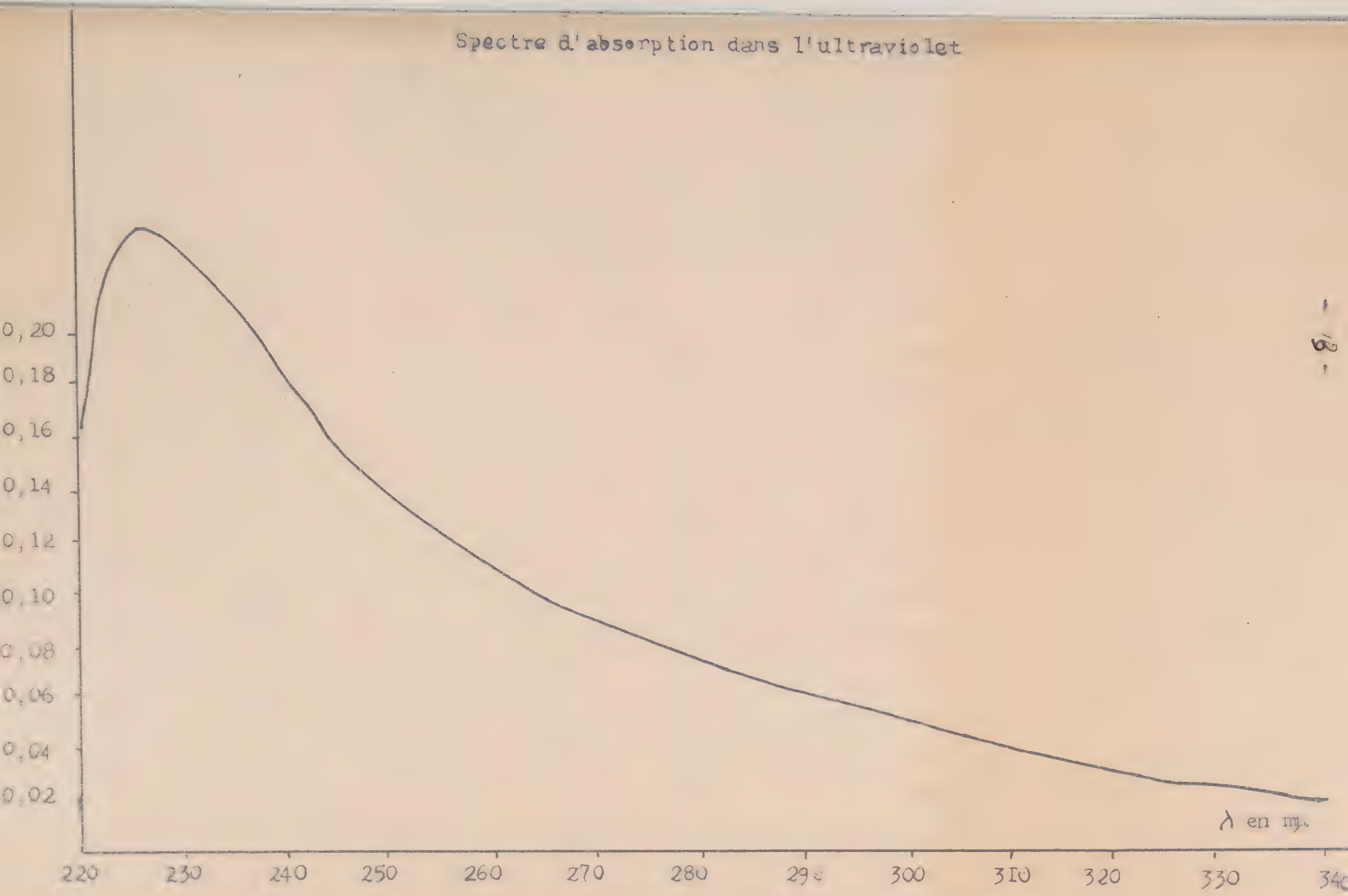
- d'un stéroïde saturé ou non saturé qui présente en position 3 un OH transoïde
- ou d'un 3 cétostéroïde saturé en 4-5 et sans OH libre.

V. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET

L'examen du spectre d'absorption d'un corps en lumière ultraviolette permet de mettre en évidence la présence dans une molécule de certains groupements chimiques chromophores qui entraînent l'apparition dans le spectre de bandes d'absorption ayant une position bien déterminée.

./..

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet



A l'aide d'un spectrophotomètre Beckman, modèle D.U nous avons établi le spectre d'absorption dans l'ultraviolet (compris entre 220 et 320 mμ) du stérol isolé de Esch. coli; le corps à étudier étant dissous dans l'éthanol absolu spécial pour spectroscopie BDH .

Un premier spectre établi seulement à partir de 230 mμ ne présente aucune bande d'absorption caractéristique, mais montre une diminution régulière de la densité optique de 230 mμ à 300 mμ . Sur un nouvel échantillon nous avons répété cet examen en étudiant cette fois les longueurs d'onde allant de 220 mμ à 320 mμ (Graphique n° 5). On observe un sommet à 225 mμ , puis la densité optique diminue ensuite rapidement, la courbe étant superposable à celle obtenue précédemment.

Or, en solution alcoolique, la seule bande intéressante qui correspond à la double liaison conjuguée donne une absorption très forte entre 235 et 245 mμ .

De ce spectre nous pouvons donc déduire que le corps que nous étudions ne possède pas de doubles liaisons conjuguées.

VI. SPECTRE D'ABSORPTION EN SOLUTION SULFURIQUE

L'acide sulfurique concentré fournit avec de nombreux stéroïdes des réactions colorées ou fluorescentes. Les colorations obtenues vont du jaune au rouge et les fluorescences du jaune à l'orange.

Théoriquement les colorations observées peuvent servir à différencier les stérols; en fait cette différenciation est très délicate.

Par contre, si l'on établit le spectre d'absorption de la réaction en fonction de la longueur d'onde, on obtient des renseignements plus précis car on note l'apparition d'une ou plusieurs bandes d'absorption caractéristiques.

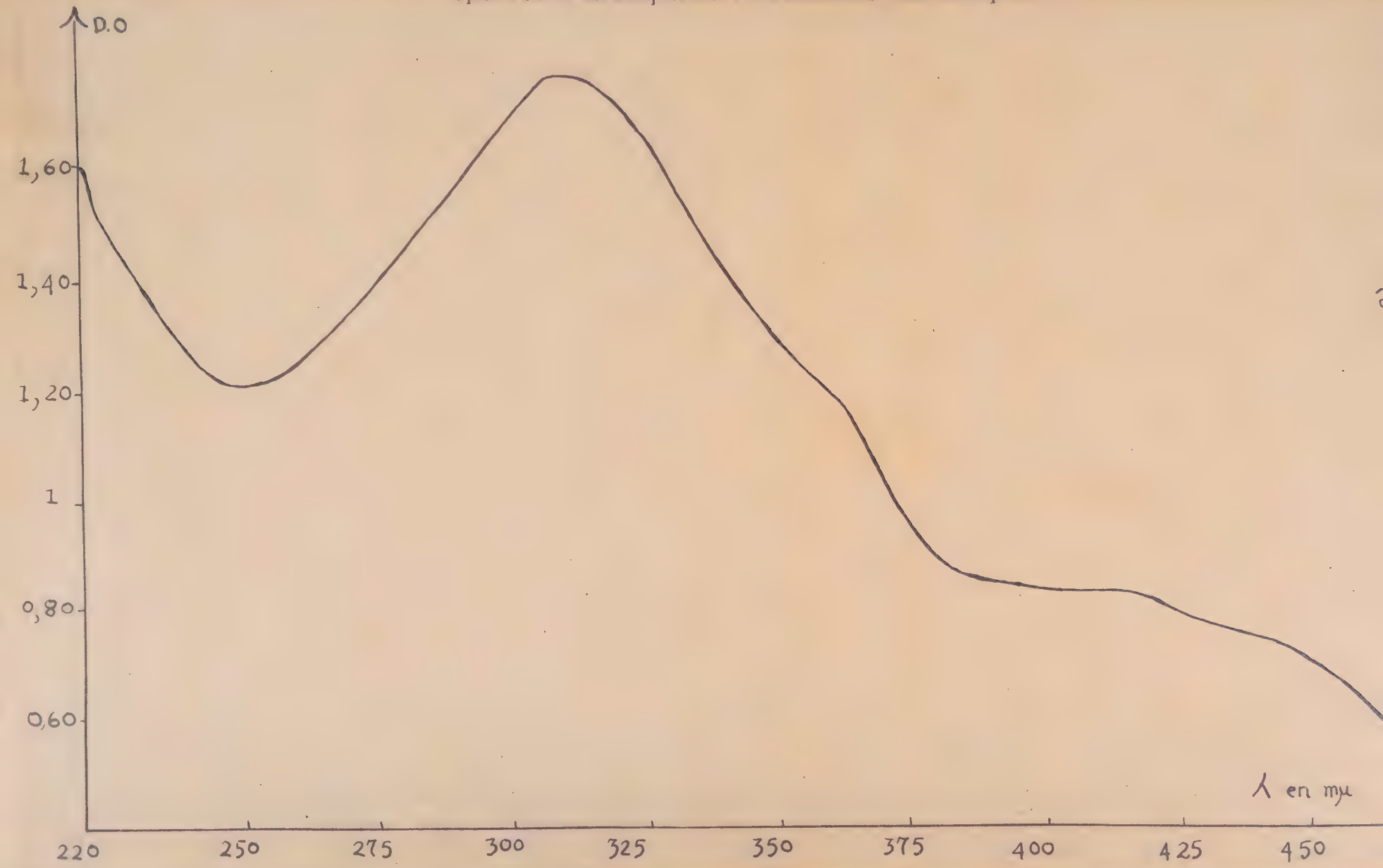
Mode opératoire

Nous employons le même mode opératoire que BERNSTEIN et LENHARDT (107). Le stérol est dissous à la dose d'environ 7.10^{-6} molécules dans 100 ml d'acide sulfurique concentré; après repos de 2 heures à 25° le spectre d'absorption de cette solution est déterminé dans l'ultraviolet et le visible de 220 à 600 mμ.

Nous avons utilisé pour ces mesures un spectrophotomètre Beckman équipé d'une lampe à hydrogène pour les longueurs d'onde allant de 220 à 320 mμ et d'une lampe au tungstène pour celles allant de 330 à 600 mμ .

L'examen des 220 spectres de stéroïdes en solution dans l'acide sulfurique publiés par BERNSTEIN en 1953 nous montre que, si les spectres des stéroïdes possédant un groupement hydroxyle présentent de nombreux maxima et minima, les spectres de stéroïdes ne renfermant comme groupement oxygéné qu'un groupement carboxyle comportent beaucoup moins d'accidents: ainsi le spectre du Δ^4 cholestenon (3) possède un seul maximum à 312 et un seul minimum à 255 alors que le Δ^5

Spectre d'absorption en solution sulfurique.



cholesténol (3) présente 4 maxima: 242, 319, 415 et 489 et 3 minima: 226, 258 et 393. De même le spectre de l'ergostane ne comporte que 2 maxima: 240 et 313 et 2 minima: 230 et 257 alors que celui de l'ergostérol présente 5 maxima: 238, 319, 419, 441 et 469 et 3 minima: 229, 256 et 400.

Or le spectre de notre composé (graphique n°6) présente un seul maximum à 311 et un seul minimum à 252. Il semblerait donc que le corps que nous avons isolé ne possède pas de groupement hydroxyle mais seulement un groupement cétone.

VII. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'INFRAROUGE

L'examen d'un corps en lumière infrarouge fournit des renseignements beaucoup plus précis que celui effectué en lumière ultraviolette. En effet, les groupements moléculaires, qui dans l'ultraviolet réalisent un chromophore global, sont divisés dans l'infrarouge en plusieurs chromophores élémentaires. Le spectre infrarouge d'une molécule organique fournit donc un nombre de bandes d'absorption qui peut atteindre 20, 25 et même 30 à tel point que l'on peut dire qu'il fournit l'empreinte digitale du corps étudié. De plus cette méthode présente le gros avantage de ne nécessiter qu'une quantité très faible de substance.

La littérature contient de très nombreuses publications concernant les spectres infrarouges des stéroïdes parmi lesquelles nous citerons les publications de ROSENKRANTZ (108) concernant les spectres d'absorption des stérols du groupe

de l'ergostérol et du cholestérol et l'atlas de DOBRINGER, KATZENELLENBOGEN et JONES (109).

L'examen du spectre infrarouge d'un corps offre deux possibilités intéressantes.

D'une part, il peut permettre une identification par comparaison empirique avec des spectres de composés connus; d'autre part, s'il ne suffit pas pour établir exactement une structure moléculaire, il peut mettre en évidence les groupements spécifiques des corps examinés.

A partir du composé que nous avons isolé par précipitation au digitonoside nous avons fait réaliser deux spectres infrarouge, ces examens effectués sur deux échantillons différents nous ont donné sensiblement les mêmes résultats (I).

Nous espérions que le spectre de notre produit coïnciderait avec l'un de ceux publiés dans l'atlas de DOBRINER; il n'en est malheureusement rien.

Nous n'avons donc pu tirer de ces examens que des déductions d'ordre très général (Figure p. 80)

Le spectre I, spectre du stérol isolé de Esch. coli a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre Baird à double faisceau. Le spectre 2 correspond également au stérol isolé de Esch. coli tandis que le spectre 3 a été effectué sur du cholestérol; ces deux derniers spectres ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer.

(I) Nous remercions très vivement le Professeur GUY de la Faculté de Pharmacie de Paris et Monsieur HADNI, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Nancy qui ont effectué pour nous ces examens.

1
2
3

L'examen des spectres I et 2 nous montre:

- Une bande intense dont le maximum est situé vers 3,4 μ, elle est banale.
- Une bande intense dans le spectre 2, beaucoup moins intense dans le spectre I et dont le maximum est situé vers 5,8 μ, cette bande peut très vraisemblablement être attribuée à un groupement C = O.
- Une bande assez intense dans le spectre I, beaucoup moins intense dans le spectre 2 et dont le maximum est situé vers 3 μ ; cette bande peut très vraisemblablement être attribuée à un groupement OH alcoolique.
- Une bande très faible vers 6 μ qui paraît imputable à l'existence d'une double liaison.
- Enfin près de I4 μ un doublet que nous n'avons pu interpréter.

Donc la confrontation des 2 spectres infrarouges réalisés sur deux échantillons préparés à plusieurs mois de distance suggère que le produit examiné est un mélange de 2 corps: l'un (prédominant dans le spectre I) présente une fonction alcool, l'autre (prédominant dans le spectre 2) comporte une fonction cétone.

VIII. SPECTRES DE DIFFRACTION DES RAYONS X.

La lecture d'un article de BEHER, PARSONS et BAKER (IIO) indiquant que les diagrammes de rayons X permettent de distinguer le digitonoside des stérols et également des complexes

digitonoside-stérol nous a incitée à effectuer de semblables déterminations sur le complexe que nous avons isolé de Esch. coli.

Les spectres des digitonides étudiés par ces auteurs présentent entre eux de grandes analogies et ont permis de montrer que les digitonides sont de vraies combinaisons et non pas le résultat de la syncristallisation d'un stérol avec le digitonoside.

Nous avons effectué les radiogrammes des poudres suivantes: digitonoside, complexes de différents stérols connus (cholestérol, ergostérol, sitostérol, stigmastérol) et du stérol isolé de Esch. coli.

Pour établir le radiogramme du digitonoside nous avons rencontré une difficulté qui n'avait pas arrêté les auteurs américains. Le digitonoside s'hydrate très facilement; des essais nous ont en effet montré qu'il fixe en 24 heures I5,3 p.IOO de son poids d'eau, c'est pourquoi par suite du gonflement le spectre obtenu ne présente que des halos, BEHER qui opérait avec un tube de plastique scellé n'avait pas été gêné par ce phénomène; pour l'éviter il nous a fallu effectuer les clichés du digitonoside entre 2 pellicules de collodion.

Nous avons opéré par la méthode de Laue en utilisant la raie k α du cuivre et un temps de pose de 20 heures. Dans ces conditions nous avons obtenu un diagramme du digitonoside facile à dépouiller et présentant notamment une raie très nette à I3,7 Å; par contre la diffusion obtenue au centre des clichés est trop intense pour permettre de repérer nettement la

raie centrale présente sur les radiogrammes des différents complexes étudiés.

Il nous a donc fallu à partir du complexe isolé de Esch. coli exécuter un cliché dans la chambre de diffraction Baudoin de 480 mm de diamètre avec un temps de pose de 20 heures.

Le spectre obtenu montre cette fois des raies nettes situées à I4,6 - 6,7 - 3,95 - 3,8 - 3,3 - 2,95 - 2,07 et I,97 Å.

La raie centrale à I4,6 Angströms semble donc bien distincte de la raie à I3,7 Å que nous avions obtenue avec le digitonoside; ceci confirme les résultats des auteurs américains qui ont constaté que la raie centrale des clichés passe de I3,7 Å pour le digitonoside à I4,I - I4,5 Å pour les différents complexes qu'ils ont étudiés.

En conclusion l'examen du radiogramme obtenu à partir du complexe de Esch. coli est un argument important en faveur de l'isolement d'un stérol sous forme de son complexe stérol digitonoside.

DISCUSSION

En résumé nous n'avons pu identifier le produit que nous avons isolé de Esch. coli mais nous apportons de nombreux arguments en faveur de sa nature stérolique.

Ce corps, qui se localise dans l'insaponifiable, présente en effet les propriétés suivantes:

I) Son point de fusion I32-I34° est de l'ordre de grandeur de nombreux stérols.

2) L'analyse centésimale C% = 81,82 , H% = 12,5 est proche de celles présentées par des stérols connus. La formule $C_{28}H_{50}O$ ne serait pas très éloignée de la composition trouvée.

3) La réaction de Liebermann est positive, sa cinétique est intermédiaire entre celle que présentent les stérols rapides (type ergostérol) et les stérols lents (type cholestérol).

4) Le digitonoside donne un précipité ce qui indique que, s'il s'agit d'un stéroïde, celui-ci possède en position 3 soit une fonction alcool transoïde avec ou sans double liaison en 5, soit une fonction cétone sans double liaison en 4-5.

5) Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet montre que le corps isolé ne présente pas de doubles liaisons conjuguées.

6) Le spectre d'absorption dans l'acide sulfurique fait présumer l'existence d'une fonction cétone.

7) Le spectre d'absorption dans l'infrarouge montre la présence d'une fonction alcool et d'une fonction cétone.

8) Le spectre de diffraction par les rayons X démontre que le corps que nous avons isolé par précipitation au digitonoside est bien un complexe stérol-digitonoside.

Si comme la formule centésimale le laisse entendre le corps que nous avons isolé de Esch. coli ne contient qu'un atome d'oxygène par molécule on pourrait conclure de cet ensemble de résultats qu'il est constitué par un mélange en proportions variables d'au moins 2 corps: l'un stérol vrai possédant une fonction alcool, l'autre stéroïde possédant une fonction cétone.

o
o o

- C H A P I T R E VI -

ESSAIS TENTES DANS LE BUT D'AUGMENTER LA TENEUR EN "STEROLS" DE ESCHERICHIA COLI.

-

L'étude d'un métabolisme ne saurait être complète si elle ne comporte des tentatives de modifications de ce métabolisme.

Nous avons donc tenté différents essais dans le but d'augmenter la teneur de Esch. coli en stérols et dans ce chapitre nous allons les passer en revue.

Deux idées directrices nous ont guidée dans cette partie de notre travail. Nous avons espéré que pourrait augmenter la biosynthèse des stérols l'addition au milieu :

- d'une part de certains composés connus pour être des chaînons intermédiaires dans la biosynthèse des stérols.
- d'autre part de certains corps qui normalement modifient la teneur des organismes en lipides.

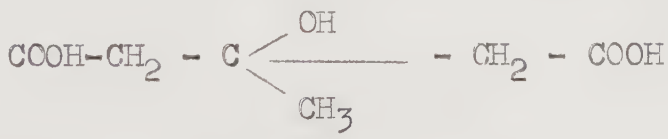
I. ADDITION AU MILIEU DE CULTURE DE COMPOSES INTERMEDIAIRES DANS LA BIOSYNTHESE DES STEROLS.

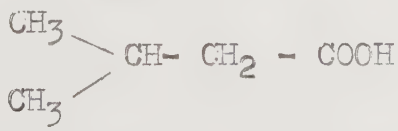
Avant d'aborder la partie expérimentale il nous faut tout d'abord résumer brièvement les notions actuelles sur la biosynthèse des stérols; ce sont en effet ces données qui ont guidé nos différents essais.

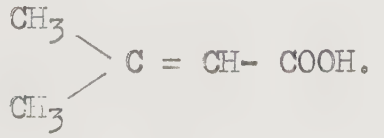
L'étude des bilans métaboliques avait fait soupçonner depuis longtemps la biosynthèse des stérols mais celle-ci n'a pu être prouvée d'une façon indiscutable que depuis l'avènement des éléments marqués. Ce sont d'abord RITTENBERG et SCHOENHEIMER (III) qui par emploi du deutérium ont prouvé la synthèse des stérols chez la souris.

Des travaux similaires sont ensuite entrepris par SONDERHOFF et THOMAS (II2) sur Saccharomyces cerevisiae et par BLOCH et RITTENBERG (II3) sur des rats. Nous ne les détaillerons pas et ne rappellerons ici que l'essentiel de ce qui est considéré aujourd'hui comme certain ou comme vraisemblable au sujet de la biosynthèse des stérols chez les êtres vivants. Tout le carbone du cholestérol peut être fourni par une molécule simple telle que l'acide acétique activé par le Coenzyme A.

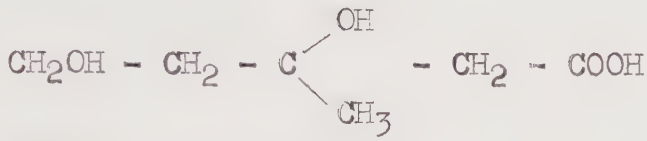
L'étape initiale est la condensation de l'acétylcoenzyme A avec lui-même pour former de l'acétoacétylcoenzyme A qui, par addition d'un nouveau groupement acétyl, est susceptible de donner différents composés à 6 atomes de carbone; ces corps par décarboxylation fournissent à leur tour des composés à squelette isoprénique susceptibles d'être in vivo comme in vitro des précurseurs du cholestérol. BLOCH (II4), RABINOWITZ et GURIN (II5), RUDNEY (II6), RUDNEY et FERGUSON (II7), ZABIN et BLOCH (II8) ont étudié depuis plusieurs années déjà, certains de ces acides en particulier l'acide β hydroxy β méthyl glutarique (ou acide dicrotalique).



l'acide isovalérique 

et l'acide β β' diméthylacrylique 

Plus récemment, en 1957, DITURI, RABINOWITZ et HULLIN (119) montrent l'utilisation par des homogénats de foie de l'acide mévalonique



BERGSTROOM et GLOOR (120) ont montré que ces mêmes composés à 5 et 6 atomes de carbone sont synthétisés également par les végétaux à partir de l'acétate.

La voie suivie par les êtres vivants pour transformer le composé isoprénique en cholestérol est moins bien jalonnée; cependant on a de fortes présomptions de penser avec DITURI, RABINOWITZ et HULLIN que deux composés isopréniques se condensent pour donner un corps voisin de l'acide géranique auquel un troisième composé isoprénique viendrait se souder pour former un corps à 15 atomes de carbone, vraisemblablement l'acide farnésique. Deux molécules d'acide farnésique s'uniraient pour donner naissance à un hydrocarbure également linéaire: le squalène.

Le squalène semble susceptible de subir facilement une tétracyclisation: TCHEN et BLOCH (121), et de se transformer par des opérations simples en lanastérol: TCHEN et BLOCH (122) qui est du 4 4' 14 α triméthyl cholesta 8 24 diène 3 β ol.

Pour CLAYTON et BLOCH (123) ce lanastérol donne directement du cholestérol. Mais ALEXANDER et SCHWENK (124) ont montré l'existence entre le lanastérol et le cholestérol

lui-même d'un nouveau précurseur: le zymostérol; il se produit une élimination des 3 groupements méthyle en excès, une hydrogénation de la double liaison dans la chaîne latérale et une translation de la double liaison 8-9 à sa position finale 5-6.

Des expériences réalisées par POPJAK (I25) montrent qu'en dehors de la chaîne de réactions que nous venons d'envisager il existerait une autre voie encore inconnue entre les composés isopréniques et le cholestérol; dans ce cas le vrai précurseur du cholestérol serait une substance avec laquelle le squalène serait en équilibre.

Il nous faut remarquer que ce schéma concerne la biosynthèse du cholestérol chez les animaux supérieurs. Pour les stérols des végétaux supérieurs et des cryptogames le mécanisme de biosynthèse n'est pas encore totalement élucidé; la présence du squalène n'est pas toujours évidente, pourtant le lanastérol est fréquemment trouvé, aussi le passage par le squalène est-il probable: BLOCH (I26).

Nos essais faits sur Esch. coli ont montré que la synthèse des stérols par cet organisme est minime; ce fait peut être dû à ce qu'un des précurseurs quelconques de ce stérol est synthétisé par Esch. coli en quantité trop faible.

Nous nous sommes donc demandé si l'on ne pourrait augmenter fortement cette biosynthèse des stérols chez Esch. coli en fournissant à ce bacille certains précurseurs; on pouvait en effet penser que l'excès de précurseur favoriserait la formation d'un enzyme susceptible de le transformer

en le précurseur suivant. Par exemple en fournissant à Esch. coli du squalène nous pouvions espérer que, s'il pénétrait dans la cellule, ce composé induirait la formation du système enzymatique capable de le transformer en stérols.

Avant d'entreprendre cette étude nous avons voulu voir si le squalène, précurseur des stérols relativement facile à caractériser, ne s'accumule pas dans le microorganisme ce qui indiquerait que l'enzyme capable de le conduire vers les stérols n'est pas susceptible d'augmenter d'activité en présence d'un excès de substrat.

A. RECHERCHE DU SQUALENE CHEZ ESCH. COLI

a) Généralités sur le squalène

Le squalène $C_{30}H_{50}$ est un triterpène constitué par 6 unités isopréniques. Très abondant dans l'huile des foies de certains poissons il se rencontre en petites quantités dans les graisses des animaux supérieurs et quelques plantes oléagineuses.

C'est une huile jaune qui possède un indice d'iode élevé (puisque sa molécule comporte 6 doubles liaisons) et qui examinée en lumière ultraviolette présente une fluorescence bleue.

Extrait par les solvants des lipides, le squalène se retrouve dans la fraction insaponifiable; il en est facilement isolé par chromatographie.

Toutes les techniques de chromatographie sont basées

sur le même principe général: l'insaponifiable préalablement dissous dans de l'éther de pétrole est versé sur une colonne d'alumine; comme les hydrocarbures (et en particulier le squalène) ne sont pas retenus par l'alumine ils sont élués très facilement par emploi d'un solvant non polaire, en général l'éther de pétrole. Pour estimer la quantité de squalène dans l'échantillon, on dispose ensuite de deux méthodes différentes:

I) soit par la réaction colorée de SOBEL (I27).

Le squalène (300 à I500 γ) dissous dans 2 ml d'anhydride acétique est additionné de V gouttes d'acide sulfurique concentré; après agitation le tube est placé au bain-marie à 38° pendant 30 minutes, puis 5 ml de chloroforme sont ajoutés et la coloration développée est lue au spectrophotomètre à 400 mμ. La loi de Beer-Lambert est respectée (du moins dans la limite des quantités ci-dessus) ce qui permet un dosage facile.

2) soit par la formation d'hexachlorure de squalène.

Cette réaction est beaucoup plus spécifique. Le principe donné par HEILBRONN (I28) en I923 est très simple : à 5 g de squalène sont ajoutés I5 g d'acétone sèche, préalablement saturée d'acide chlorhydrique gazeux; dans cette solution refroidie l'on fait ensuite barboter un courant d'acide chlorhydrique gazeux. La solution primitivement incolore passe au rouge et l'on obtient un précipité bien cristallisé d'hexachlorure de squalène.

b) Expériences personnelles de caractérisation du squalène chez Esch. coli.

Nous avons employé les deux méthodes classiques:

I) Emploi de la réaction de SOBEL

Les lipides de 5.36 g de colibacilles secs sont extraits suivant la méthode que nous avons décrite page 29 , saponifiés puis chromatographiés selon la technique de LANGDON et BLOCH (I29) détaillée page 38 .

Les fractions éthero-pétroliques sont réunies,(examinées sous lumière ultraviolette elles montrent une forte fluorescence bleuâtre) puis évaporées sous gaz carbonique. On obtient un résidu jaune qui semble huileux.

Ce résidu est traité selon la technique de SOBEL déjà décrite; après 30 minutes on obtient une coloration jaunâtre dont la densité optique, lue au spectrophotomètre Coleman junior à 400 mμ , est de 0.22. En fait la coloration obtenue nous semble différer notablement de celle du squalène pur (squalène fourni par l'Alimentation Equilibrée et repurifié par chromatographie). Ceci n'exlut pas que la coloration due au squalène existe mais soit masquée par des impuretés; la réaction de SOBEL ne nous permet donc de conclure ni à la présence ni à l'absence de squalène chez Esch. coli. Nous nous sommes adressée ensuite à une réaction plus spécifique,

2) Formation d'hexachlorure de squalène

Les lipides de 38 g de colibacilles secs sont extraits selon le schéma d'extraction que nous avons décrit page 30 ,

saponifiés puis chromatographiés selon la technique de CMELIK (130) détaillée page 38 .

Les fractions éthéro-pétroliques sont réunies et évaporées sous vide; on obtient une huile jaune foncé (se figeant par séjour au froid) et qui examinée en lumière ultraviolette présente une très forte fluorescence bleuâtre.

Cette huile se dissout entièrement dans l'acétone mais par refroidissement précipite; on ne peut donc précipiter directement dans cette solution l'hexachlorure de squalène et il faut tout d'abord éliminer la partie insoluble à froid. C'est pourquoi la solution acétonique additionnée d'un demi volume d'alcool méthylique est centrifugée à froid; la solution surnageante décantée précipite à nouveau par refroidissement, on procède donc à une nouvelle centrifugation. Après 5 refroidissements et centrifugations successifs on obtient finalement une solution qui reste limpide à froid; le solvant est alors chassé (la formation d'hexachlorure de squalène doit se faire en effet en milieu acétonique et il faut éliminer l'alcool méthylique ajouté). Le résidu est repris par de l'acétone saturée d'acide chlorhydrique puis traitée suivant la technique de HEILBRONN.

La solution passe du jaune au rouge foncé mais on n'obtient absolument aucune précipitation.

Comme un essai préalable fait sur du squalène avait montré une précipitation très nette on peut conclure que, malgré la réaction douteuse fournie par la réaction de SOBEL, Esch. coli ne contient pas de squalène, du moins en quantité déce-

lable dans nos conditions expérimentales.

B. UTILISATION DE DIFFERENTS SUBSTRATS CARBONES CONNUS COMME DES INTERMEDIAIRES DANS LA BIOSYNTHESE DES STEROLS.

I) Culture sur acétate

BLOCH et RITTENBERG (I3I) estiment que, chez le Rat, la moitié au moins des atomes de carbone dérivent de l'acétate. Il était donc logique de commencer nos essais par l'emploi de l'acétate.

a) Essai de culture de Esch.coli sur milieu à l'acétate.

Un premier essai en tubes nous a montré que Esch. coli sur un milieu synthétique contenant comme source de carbone de l'acétate de sodium ne se développe que très lentement; après 3 jours à 37°, la densité optique de la culture atteint à peine 0,I5.

Nous avons donc fait des essais sur des milieux contenant d'une part des quantités décroissantes d'acétate de sodium, d'autre part des quantités croissantes de glucose.

Les quantités d'acétate sont calculées en tant compte des équivalents carbone (I molécule de glucose $C_6H_{12}O_6$ correspond à 3 molécules d'acétate de sodium cristallisé $CH_3COONa,3\ H_2O$; donc pour remplacer I0 g de glucose il faut 22,7 g d'acétate de sodium cristallisé). Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau n° 7.

./.

- Tableau N° 7 -

N° des tubes	Teneur en glucose en g p. I000	Teneur en acétate en g p. I000	Densité optique après: 24 h.	48 h.
I	0	22,70	0,02	0,04
2	0,50	2I,57	0,04	0,08
3	I	20,53	0,06	0,09
4	I,50	I9,30	0,09	0,I3
5	2	I8,I6	0,II	0,I6
6	2,50	I7,03	0,I2	0,I8
7	3	I5,89	0,I4	0,2I
8	3,50	I4,76	0,I5	0,I9
9	4	I3,60	0,20	0,26
I0	5	II,37	0,I9	0,27
II	7,5	5,68	0,24	0,30
I2	I0	0	0,2I	0,29

De ce tableau l'on peut conclure que, en milieu non aéré, la croissance a lieu en fonction du taux de glucose présent, l'acétate n'étant sans doute pas utilisé.

Des essais ont ensuite été réalisés en milieu aéré: on utilise de petits ballons de 250 ml contenant chacun I50 ml de milieu et à l'aide d'une trompe à vide on réalise un barbottage continu d'air.

Le milieu utilisé est du milieu synthétique ne contenant pas de glucose mais 22,7 p. I000 d'acétate de sodium cristallisé.

Après 48 heures la croissance est satisfaisante puisque

nous lisons dans 4 essais différents des densités optiques de 0,36. 0,40. 0,46 et 0,52.

Donc en milieu synthétique fortement aéré, Esch. coli atteint en 48 heures une croissance suffisante, même lorsque la seule source de carbone est de l'acétate de sodium.

En utilisant une teneur moins élevée en acétate de sodium (IO g p.IOOO au lieu de 22,7) les résultats obtenus sont aussi satisfaisants: 3 essais différents nous donnent après 48 heures des densités optiques de 0,36. 0,4I et 0,43.

De sorte que par la suite, dans nos essais, nous avons employé notre milieu synthétique habituel où les IO g de glucose étaient remplacés par un poids égal d'acétate de sodium cristallisé et avons veillé à assurer toujours une bonne aération.

b) Dosage des stérols dans Esch. coli cultivé sur milieu à l'acétate de sodium

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 8. L'un des dosages a été réalisé sur une assez grande quantité de Esch. coli (20,I4 g) ce qui a permis la pesée du complexe stérol digitonoside.

Pour les autres dosages, ne disposant que de quantités plus faibles de bacilles, nous avons adopté la méthode de SPERRY-WEBB (I32).

./..

Tableau N° 8

Nombre de litres de milieu.		96	I2	I5	I0	I0
Poids de bacilles secs en g		20,I4	3,98	5,83	3,II	4,89
Lipides totaux en g.	dans l'échantillon	I,460	0,I78	0,255	0,2I3	0,3I8
	pour I00 g de bacilles secs	7,24	4,47	4,37	6,84	6,50
Complexe en mg dans l'échantillon		3,I9	0,76	I,22	0,67	I,05
Stérols en mg pour I00 g de bacilles secs.		3,9	4,7	5,2	5,4	5,4

En conclusion : Ces résultats nous montrent que la substitution de l'acétate de sodium au glucose ne paraît pas modifier sensiblement la teneur en stérols de Esch.coli; dans les deux cas, la moyenne est sensiblement de 5 mg pour I00 g de bacilles secs.

2) Culture sur acide β,β' diméthylacrylique

Puisque les étapes successives de la biosynthèse des stérols sont fort nombreuses on peut très bien imaginer que la faible teneur en stérols de Esch. coli est due à une défaillance de la biogénèse à un stade intermédiaire.

Nous avons donc pensé que, si Esch. coli ne peut synthétiser beaucoup de stérols directement à partir de l'acétate, il le pourrait peut-être si on lui fournissait comme aliment un des acides en C5 intermédiaire dans cette synthèse.

BLOCH (I33) étudiant l'utilisation des acides gras à chaîne latérale méthylée pour la biosynthèse des stérols chez le jeune Rat montre que, à l'exception de l'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique, l'efficacité de ce processus est faible; c'est donc à cet acide que nous nous sommes adressée. L'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique n'existant pas dans le commerce, nous l'avons synthétisé suivant la technique de BARBIER et LESER (I34).

a) Synthèse de l'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique

La synthèse de cet acide $(CH_3)_2C = CH.COOH$ est très simple à partir de l'oxyde de mésityle $(CH_3)_2C = CH-CO-CH_3$

Mode opératoire

Nous avons suivi textuellement les indications de BARBIER et LESER: "260 g de soude sont dissous dans de l'eau en quantité suffisante; dans cette solution bien refroidie on recueille le chlore dégagé suivant la méthode de GRAEBE par la réaction de 680 ml d'acide chlorhydrique concentré sur I50 g de permanganate de potassium; à cette solution d'hypochlorite de sodium, on ajoute peu à peu 75 g d'oxyde de mésityle pur et on agite; le mélange s'échauffe considérablement et quand il est revenu à la température ordinaire la réaction est terminée. Il suffit alors de détruire le petit excès d'hypochlorite de sodium par un peu de bisulfite de soude, de décanter le chloroforme qui s'est formé et de sursa-

turer par l'acide sulfurique. Il se fait un abondant précipité cristallin qu'il suffit d'essorer; les eaux mères filtrées sont épuisées à l'éther et le résidu d'évaporation de l'éther est joint aux cristaux séparés par filtration. Les cristaux sont repris par l'eau chaude où ils se dissolvent très facilement. Par refroidissement, l'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique se dépose en magnifiques aiguilles fusibles à 69-70°. Théoriquement 75 g d'oxyde de mésityle donne 75 g d'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique. Pratiquement on obtient environ 50 g de produit".

b) Milieu de culture employé

Pour ne pas abaisser le pH du milieu de culture (voisin de 7,2), l'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique est utilisé sous forme de son sel de sodium à la dose de 6.60 p.1000 d'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique (cette dose est calculée en tenant compte des équivalents carbone entre le glucose et l'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique).

Nous avons craint qu'une stérilisation à l'autoclave ne décompose cet acide et avons procédé à sa stérilisation par filtration sur bougie L3 .

Des essais faits sur milieu synthétique ne contenant comme source de carbone que du $\beta\beta'$ diméthylacrylate de sodium ne montrent (même après 48 heures) aucun développement microbien.

Nous avons ensuite fait des essais avec des doses croissantes de $\beta\beta'$ diméthylacrylate de sodium et décroissantes de

glucose, comme nous l'avions fait pour l'acétate de sodium, c'est-à-dire sans aération. Le tableau N° 9 indique les résultats obtenus.

Tableau N° 9

N°des tubes	Teneur en acide ββ' diméthylacrylique p.IOOO	Teneur en glucose p.IOOO	Densité optique après 24 h	32 h
I	I,65	7,50	0,37	0,40
2	3,30	5	0,32	0,33
3	3,96	4	0,27	0,27
4	4,62	3	0,I9	0,I9
5	5,28	2	0,I5	0,I5
6	5,94	I	0,I0	0,I0
7	6,60	0	0,03	0,03

Les chiffres obtenus montrent que la croissance de Esch. coli est fonction du taux de glucose et non celui de ββ' diméthylacrylate de sodium.

Un essai témoin (tableau n° IO) fait avec les mêmes doses décroissantes de glucose et sans ββ' diméthylacrylate de sodium nous a même montré que l'addition de ce précurseur des stérols au lieu d'augmenter la croissance de Esch. coli la diminue légèrement.

./...

Tableau N° IO.

N° des tubes	Teneur en glucose p. IOOO	Densité optique après 24 h	Densité optique après 32 h
I	7,50	0,40	0,4I
2	5	0,37	0,4I
3	4	0,32	0,33
4	3	0,24	0,24
5	2	0,I8	0,I8
6	I	0,I0	0,I0

Nous voyons ainsi par exemple, que si le milieu contenant 5 g p. IOOO de glucose permet d'atteindre en 32 heures une densité optique de 0,4I, celui contenant 5 g de glucose p.IOOO + 3,30 de $\beta\beta'$ diméthylacrylate de sodium p.IOOO ne permet d'atteindre qu'une densité optique de 0,33.

Pour tenir compte de ces résultats, la culture de Esch. coli a donc été réalisée sur milieu contenant du glucose à un taux élevé (9 g.p.IOOO) et une quantité assez faible d'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique (I g p.IOOO); une bonne aération du milieu a été assurée. Nous n'avons procédé qu'à un seul essai; le résultat obtenu selon la technique B, décrite p.42 , est le suivant :

Nombre de litres de milieu : 5

Poids de bacilles secs : 2,37 g

Lipides totaux dans l'échantillon : 0,26I g

Lipides totaux en g pour IOO g de bacilles secs : II

Complexe en mg dans l'échantillon : 0,50

Stérols en mg pour IOO g de bacilles secs : 5,4

En conclusion: Ces résultats indiquent que l'addition au milieu de culture d'acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique ne paraît pas modifier sensiblement la teneur en stérols de Esch. coli.

3) Culture en présence de squalène

Nous avons montré que Esch. coli ne contient pas de squalène (du moins en quantité décelable); on pouvait donc penser que la teneur très faible de Esch. coli en stérols provient d'une incapacité à synthétiser préalablement le squalène et espérer que l'apport de squalène augmenterait la biosynthèse des stérols chez Esch. coli.

Des essais réalisés sur milieu synthétique ne contenant comme source de carbone que du squalène ne présentent (même après 48 heures) aucun développement microbien.

Nous avons donc utilisé un milieu contenant à la fois du glucose et du squalène au taux respectif de IO et I g p. IOOO.

IO g de squalène sont dissous dans I20 ml d'alcool absolu; on obtient une solution limpide que l'on stérilise par filtration sur bougie. Cette solution alcoolique est ajoutée à IO litres de milieu synthétique glucosé stérile; le squalène s'insolubilise et forme un film en surface mais il est remis en suspension par l'aération réalisée pendant la culture.

Nous n'avons procédé qu'à un seul essai; le résultat obtenu selon la technique B, page 42 est le suivant :

Nombre de litres de milieu : 10

Poids de bacilles secs : 4,59 g

Lipides totaux dans l'échantillon: 0,492 g

Lipides totaux en g pour 100 g de bacilles secs: 10,7

Complexe en mg dans l'échantillon : 0,210

Stérols en mg pour 100 g de bacilles secs : 4,5.

En conclusion: Ces résultats nous montrent que l'additionau milieu de culture de squalène ne paraît pas modifier sensiblement la teneur en stérols de Esch. coli.

4) Culture en présence de leucine

Les groupements méthyle de l'acide isovalérique [in FRUTON SIMMONDS, p. 551 (135)] provenant de la dégradation de la leucine sont utilisés pour la production du cholestérol environ 5 fois plus que l'acide acétique.

Nous avons donc fait un essai sur du milieu synthétique contenant, en plus du taux habituel de glucose, 1,5 g de leucine par litre de milieu.

Nous n'avons procédé qu'à un seul essai; le résultat a été obtenu par la technique B, comme précédemment:

Nombre de litres de milieu : 10

Poids de bacilles secs : 3,70 g

Lipides totaux dans l'échantillon: 0,353 g

Lipides totaux en g pour 100 g de bacilles secs: 9,54

Complexe en mg dans l'échantillon: 0,65

Stérols en mg pour 100 g de bacilles secs: 4,5

En conclusion: Ces résultats nous montrent que l'addition au milieu de culture de leucine ne paraît pas modifier sensiblement la teneur en stérols de Esch. coli.

II. ADDITION AU MILIEU DE CULTURE DE CORPS QUI NORMALEMENT MODIFIENT LA TENEUR DES MICROORGANISMES EN LIPIDES

La teneur des microorganismes en lipides varie beaucoup en fonction du milieu de culture.

Il nous a semblé intéressant de provoquer des modifications de la teneur en lipides totaux espérant que cette variation aurait un retentissement sur la biosynthèse des stérols.

A. CULTURE SUR GLYCEROL

DAWSON (I36) en I9I9 a montré que l'addition de glycérol provoque une augmentation de la teneur en lipides chez Esch. coli. Cette teneur qui est normalement de 4,5 à 5% passe en effet à 8%.

Des essais préliminaires réalisés en employant un milieu synthétique ne contenant comme source de carbone que du glycérol au taux de I0 g. p.I000 nous montrent que cette quantité n'est pas suffisante pour obtenir un rendement microbien satisfaisant; par contre l'emploi de 20 g p.I000 de glycérol permet en 24 heures une croissance normale de Esch. coli.

Le milieu utilisé est donc du milieu synthétique non glucosé mais contenant 20 g p.I000 de glycérol.

Cinq essais différents ont été réalisés selon la techni-

que B et sont résumés dans le tableau suivant N° II.

Tableau N° II

Nombre de litres de milieu		5	5	5	I2	I2
Poids de bacilles secs en g		I,95	2,40	2,59	6	6,28
Lipides totaux en g	dans l'échantillon	0,2I9	0,263	0,259	0,382	0,43I
	pour I00 g de bacilles secs.	II,23	I0,95	I0	6,37	6,87
Complexe en mg dans l'échantillon		0,70	0,58	0,98	I,44	I,28
Stérols en mg pour I00 g de bacilles secs.		8,9	6	9,4	6	5,I

En conclusion: Ces résultats nous montrent que la substitution du glycérol au glucose paraît modifier légèrement la teneur en stérols de Esch. coli.

En effet alors que chez Esch. coli cultivé sur glucose nous avons trouvé une teneur moyenne de 5 mg de stérols pour I00 g de bacilles secs nous obtenons ici un chiffre moyen de 7,I mg.

De plus, comme l'avait déjà montré DAWSON, on note une augmentation de la teneur en lipides qui de 6,87 g passe à 9,08 g pour I00 g de bacilles secs.

B. CULTURE SUR MILIEU HYPERTONIQUE

Nous inspirant des conclusions de RAVEUX (I37) nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier la biosynthèse des stérols chez Esch. coli cultivé sur un milieu hypertonique.

L'augmentation de pression osmotique a été obtenue en

enrichissant le milieu en sulfate d'ammonium. Le milieu employé a donc la même composition que notre milieu synthétique normal, seule la teneur en sulfate d'ammonium est fortement augmentée (23,65 g p.I000 de sulfate d'ammonium au lieu de 4,73 g, soit 5 fois plus).

Un essai préalable indique que sur un tel milieu glucosé à I0 g p.I000 la croissance de Esch. coli est satisfaisante.

Deux essais seulement ont été réalisés selon la technique B. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant n° I2.

Tableau N° I2

Nombre de litres de milieu		I0	I2
Poids de bacilles secs en g		4,32	6,35
Lipides totaux en g	dans l'échantillon	0,403	0,422
	pour I00 g de bacilles secs	9,55	6,64
Complexe en mg dans l'échantillon		0,36	I,40
Stérols en mg pour I00 g de bacilles secs		2,I ?	5,5

En conclusion: La culture sur milieu hypertonique ne semble pas augmenter la teneur en stérols de Esch. coli.

o
o o

- CONCLUSIONS GENERALES -

Nous avons commencé notre travail par une mise au point des données bibliographiques concernant la présence des stérols chez les bactéries.

Envisageant successivement les Mycobacteriaceae, les Corynebacteriaceae, les Enterobacteriaceae et les Azotobacteriaceae, nous avons vu que de nombreux auteurs nient la présence de stérols chez ces différents microorganismes; quelques-uns cependant l'affirment. Aussi l'absence de stérols chez les bactéries n'est-elle pa s une certitude absolue; il nous paraît légitime d'adopter une opinion plus nuancée: si les bactéries renferment des stérols, cette teneur est minime ce qui les rend difficilement décelables.

-=-=-=-=-

Dans un deuxième chapitre nous avons examiné les principales méthodes de dosage des stérols en les classant ainsi:

I) Réactions colorées (et plus spécialement réactions d'halochromie et d'halofluorie)

II) Réactions de précipitation

III) Méthodes physiques.

-=-=-=-=-

Dans un troisième chapitre nous indiquons comment nous avons procédé pour obtenir notre materiel d'étude.

Esch. coli est un bacille peu exigeant au point de vue

métabolique et la souche que nous avons employée est peu pathogène; de plus la culture de ce bacille est rapide et l'on obtient en 24 heures un rendement microbien satisfaisant; c'est donc à Esch. coli cultivé sur milieu synthétique que nous nous sommes adressée.

Nos premiers essais ont porté sur des cultures en ballons de 3 litres. Par la suite pour disposer de plus grandes quantités de bacilles, il nous a fallu faire construire un incubateur permettant d'ensemencer en une seule opération 50 litres de milieu.

-=-=-=-=-

Le quatrième chapitre est consacré à l'isolement et aux dosages de stérols chez Esch. coli cultivé sur milieu glucose-sels.

Les stérols sont toujours extraits en même temps que des quantités relativement considérables de lipides dont il faut les débarrasser avant le dosage.

Nous décrivons successivement les deux modes d'extraction des lipides que nous avons employés; puis la méthode de saponification et d'extraction de l'insaponifiable. Après quelques généralités sur la chromatographie nous détaillons les trois techniques de chromatographie que nous avons tenté d'appliquer à l'étude de l'insaponifiable de Esch. coli.

Enfin nous envisageons le dosage lui-même des stérols qui a été effectué selon trois méthodes différentes et en détaillons le mode opératoire.

Dix huit dosages réalisés selon des méthodes différentes et sur des échantillons dont le poids variait dans de très larges limites (2,05 g à 283,3 g) nous ont donné des résultats assez homogènes (3 mg à 7,5 mg pour I00 g de bacilles secs) et dont la valeur moyenne est de 5 mg pour I00 g de bacilles secs.

Comme nous avons veillé à éviter au cours des manipulations tout apport extérieur de stérols nous pouvons conclure que Esch. coli contient environ 5 $I0^{-5}$ de son poids sec d'un corps donnant les réactions habituelles de stérols.

-=-=-=-=-=-

Dans un cinquième chapitre nous avons tenté l'identification du produit précédemment isolé.

Après cinq recristallisations, le point de fusion reste constant et voisin de I32-I34°.

Dans la composition centésimale déterminée par microanalyse C = 8I.82% et H = I2,5 %.

Le produit étudié fournit une réaction de Liebermann dont la cinétique est intermédiaire entre celles de l'ergostérol et du cholestérol et dont le spectre d'absorption a été déterminé.

Le digitonoside donne un précipité cristallin et les rayons X ont montré qu'il s'agit bien d'un complexe.

Cet ensemble de caractères permet de penser que le produit étudié est un stérol ou un stéroïde.

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet a été déter-

miné ainsi que le spectre d'absorption en solution sulfurique et le spectre d'absorption dans l'infrarouge.

L'ensemble de ces mesures physiques nous permet de penser que le produit que nous avons isolé de Esch. coli est un mélange d'au moins 2 corps un stérol vrai et un stéroïde.

-=-=-

Enfin dans un dernier chapitre nous avons tenté d'augmenter la teneur en stérols de Esch. coli en ajoutant au milieu de culture des composés chimiques connus pour être des précurseurs des stérols: acétate, acide $\beta\beta'$ diméthylacrylique, squalène, leucine. Aucun de ces corps ne modifie la teneur en stérols du bacille étudié. Par contre des cultures faites sur un milieu glycérolé nous ont permis d'obtenir une légère augmentation de la teneur en lipides totaux et également de la teneur en stérols.

-=-=-=-=-=-=-

Au total nous avons pu extraire régulièrement de Esch. coli un produit présentant diverses propriétés des stérols et qui, en moyenne, s'y trouve à la concentration de 5 mg pour IOO g de bacilles secs.

o
o o

- BIBLIOGRAPHIE -

La bibliographie est classée par ordre alphabétique; les méros correspondent à l'ordre de citation dans le texte.

3) AEBI (A), ASSELINEAU (J) et LEDERER (E):
Sur les lipides de la souche humaine "Brévannes" de Mycobactérium tuberculosis. Bull. Soc.Chim. Biol.1953,35, 661-84.

24) ALEXANDER (G), SCHWENK (E):
Studies on biosynthesis of cholesterol IX. Zymosterol as a precursor of cholesterol. Arch.Biochem. Biophys.1957, 66, 381-87.

I) ANDERSON (R.J),SCHOENHEIMER (R),CROWDER (J.A.),STODOLA (F.H):
Die Chemie der Tuberkelbazillen Lipoïde. XL. Uber das Vorkommen von Sterinen in Tuberkelbazillen. Ztschr. physiol. Chem. 1953, 237, 40.

2) ASSELINEAU (J), LEDERER (E):
Cires du bacille tuberculeux, acide mycolique et acido-résistance. Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 492-501.

) ASSELINEAU (J), LEDERER (E):
Chimie des lipides bactériens. Forstchritte der Chemie organische Naturstoffe. 1953, 10, 170-273.

I) AUCLAIR (J), PARIS (L) :
Constitution chimique du bacille de Koch et de la substance unissante. Ses rapports avec l'acido-résistance. Arch. Med. exp. Anat. path. 1907, 19, 129-44.

34) BARBIER (P.H), LESER (G):
Sur la préparation de l'acide diméthylacrylique. Bull. Soc. Chim. 1905, 33, 815.

10) BEHER (W.T.), PARSONS (J), BAKER (G.D.):
Comparative value of X ray diffraction and infrared Spectrophotometry in identifying certain sterols and their digitonides. Anal.Chem. 1957, 29, 1147-51.

)(15)(20) BEHRING (H.V):
Enthalten Bakterien Sterine?. Ztschr. physiol. Chem. 1930, 192, 112.

) BERGMANN (W) :
The plant sterols. Annual Review of Plant Physiology.1953, 4, 383-426.

20) BERGSTRÖM (S), GLORR (U) :
in Annual Review of Biochemistry 1956, 25, 614.

(I07) BERNSTEIN (S), LENHARD (R.H) :
The absorption spectra of steroïds in concentrated sulfuric acid. J. organ. Chem. I953, I8, II46-65.

BEUMER (H), HEPNER (F):
Uber die Ausscheidungswege des Cholesterins. Ztschr. experim. Medizin. I929, 64, 787.

4) BLOCH (K):
The biological synthesis of cholesterol. Harvey Lectures I952-I953, 68-88, New-York, Academic Press, Inc. I954, 296p.

3) BLOCH (K):
Biological synthesis of cholesterol. Record. Chem.Progr. I954, I5, I03-9.

5) BLOCH (K):
Chemical structure as a guide to the study of biochemical syntheses. In: Currents in biochemical research I956, Ed. by D.E. GREEN. New York, Interscience publ. I956, 474-92.

6) (I3I) BLOCH (K), RITTENBERG (D):
Estimation of acetic acid formation in rat. J.biol.Chem. I945, I59, 45-58.

BLOOR (W.R.) :
Determination of small amounts of lipid in blood plasma. J. biol. Chem. I928, 77, 53-73.

BURCHARDT (H). Chem. Zbl.I890, I, 25, cité par PESEZ et POIRIER.

(8I) CAMINADE (R):
Sur quelques modifications apportées au dosage de la cholestérine par la méthode de Windaus. Bull. Soc. Chim. biol. I922, 4, 60I-I3.

CHAIN (E.B), PALADINO (S), CALLOW (D.S), UGOLINI (F), VAN DER SLUIS (J) :
Studies on aeration. Premier Symposium international de Chimie microbiologique, I952, I0, 73-97.

CHARGAFF (E):
Über die Lipoïde des Bacillus Calmette-Guérin. Ztschr. physiol.Chem. I933, 217, I15.

CHARGAFF (E):
Uber das Fett und das Phosphatid der Diphteriebakterien. Ztschr. physiol. Chem. I933, 218, 223.

I03) CHEVALLIER (F) :
Le cholestérol: données chimiques et apport des méthodes isotopiques dans la connaissance de son métabolisme. Ann. Nutrit. Aliment. I953, 7, 225-43.

I23) CLAYTON (R.B), BLOCH (K) :
The biological conversion of lanosterol to cholesterol. J. biol. Chem. I956, 2I8, 3I9-25.

25) (72) (78) (I30) CMELIK (S) :
Über Bakterien lipoïde. Ztschr. physiol. Chem. I952, 290, I46-53 - I953, 293, 222-228 - I954, 296, 67-73.

59) COSTELLO (R.L), CURRAN (G.L):
Modified turbidimétrie procedure for determination cholesterol. Amer. J. Clin. Pathol. I957, 27, I09-II6.

27) CROWDER (J.A), ANDERSON (R.J) :
A contribution to the chemistry of lactobacillus acidophilus. J. biol. Chem. I934, I04, 399-406.

85) DAUCHY (S), KAYSER (F) et VILLOUTREIX (J):
Présence de corps donnant les réactions des stérols chez Esch. coli. C.R. Soc. biol. I956, I50, I974.

86) DAUCHY (S), et KAYSER (F).:
Présence de corps donnant les réactions des stérols chez Esch. coli. Bull.Soc.Chim.biol. I958,sous presse.

I36) DAWSON (A.I) :
Bacterial variations induced by changes in the composition of culture media. J. Bact. I9I9, 4, I33.

60) DELSAL (J.L) :
Microdosage colorimétrique du cholestérol libre. Bull. Soc. Chim. Biol. I946, 228, 44I.

3I) DHERE (C.H), LASZT (L) :
Etude spectrochimique (absorption et fluorescence) de la réaction de Salkowski. C.R. Soc.Biol. I949, I43, 444-47.

II9) DITURI (F), RABINOVITZ (J), HULLIN (R.P), GURIN (S):
Precursors of squalene and cholesterol. J.biol. Chem. I957, 229, 825-36.

I09) DOBRINER (K), KATZENELLENBOGEN (E.R.), JONES (R.N) :
"Infrared absorption spectra of steroids "New York Interscience, I953, 45p,et 308 planches.

96) ECK (J.C), THOMAS (B.H) :
The chemical activation of sterols. J.biol.Chem.I939, I28, 257-65.

(2I) ECKSTEIN (H.C), SOULE (M.H) :
The nature of the proteins and lipides synthetized by Colon bacillus. J.biol.Chem. I93I, 9I, 395.

(9I) EVANS (E.A), SCHOENHEIMER (J.R):
Epi allocholesterol, a new isomer of cholesterol. Proc.Am. Chem. Soc. I936, I08, I92.

(53) FABRE (R):
Sur l'allophanate de cholestérol et son emploi en chimie biologique. C.R.Ac.Sc. I926, I83, 679.

(I05) FERNHOLZ (E):
Notiz über das Verhalten von Sterinabkömmlingen gegenüber Digitonin. Ztschr. physiol.Chem. I935, 232, 97-I00.

(I35) FRUTON (J.S), SIMMONDS (S):
Biochemistry. New York, J Wiley, I953, 940 p.

(94) GILMAN (H) :
Organic Chemistry. New York. J.Wiley, I947, I98I p.

(8) GORIS (A):
Composition chimique du bacille tuberculeux. Ann. Inst. Pasteur, I920, 34, I497.

(34) GRIGAUT (A) :
Le cycle de la cholestérinémie. Thèse Med.Paris I9I3

(I7) GUBAREV (E.M), LUBENEC (E.K), GALAEV (Yu.V) :
Biokhimya .I953, I8, 37-46 in chem. Abst.I953, 7593 i.

(62) GUY (J), DELTOUR (G.H), WEINMANN (S.H) :
Dosage du cholestérol dans le sérum sanguin par spectrophotométrie infrarouge. Ann. Biol.clin. I955,I3,43-48.

(5) HAMMERSCHLAG.- Centralbl. f. innère Medizin. I89I, cité par TAMURA.

(I0) HECHT (E) :
Zur Frage des Steringehalten von Bakterien, insbesondere des tuberkelbazillus zugleich ein methodischer Beitrag zum Nachweis des Cholesterins. Ztschr. physiol. Chem. I935, 23I, 29.

(24) HECHT (E) :
Zur Frage des Steringehaltes von Bakterien. Ztschr. physiol. Chem. I935, 23I, 279.

(I28) HEILBRONN (I.M),KAMM (E.D), OWENS (W.M):
The unsaponifiable matter from the oils of Elasmobranch Fisch. Part I. A contribution to the study of the constitution of squalène (Spinacene). J.Chem.Soc.I926,I, I630-44.

2) HONEYWELL (E.M), BILLS (C.E) :
Cerevisterol. New notes on composition, properties and relation to other sterols. J.biol.Chem. I933, 103, 5I5-20.

8) (IOI) IDDLER (D.R), BAUMANN (C.A) :
Skin sterols, III. Sterol. structure and the Liebermann-Burchardt reaction. J.biol. Chem.I953, 203, 389-96.

3) JONES (K.K) :
A micromethod for fat analysis based on formation of monolayer films. Science. I950, III, 9-IO.

7) KAYSER (F) , MATHIEU (C):
Technique du dosage du cholestérol par oxydation chromique. Bull.Soc. Chim. I939, 6, 7I5-7.

3) KUHN, LEDERER, WINTERSTEIN:
Ber, I93I, 64, I349 cité par MEUNIER.

0) LAMB,(F.W), MUELLER (A), BEACH (G.W) :
Estimation of cholesterol and dehydro 7 cholesterol. Indust.eng.Chem. I946, I8, I87-90.

7)(I29) LANGDON (R.G), BLOCH (K):
The biosynthesis of squalene. J.biol.Chem. I953, 200, I29.

2) LIEBERMANN (C) :
Ber.dtsch.chem.Gesellsch. I885, I8, I803-9, cité par PESEZ et POIRIER.

5) LIFSCHUTZ (I) :
Biochem.Z. I9I3, 48, 373, cité par PESEZ et POIRIER.

8) LUBENEC (E.K) :
Les lipides liés chez Corynebact. diphteriae. Biokhimiya. I954, I9, II-5.

5) MACHEBOEUF (M), DELSAL (J.L) :
Recherche sur le dosage colorimétrique de petites quantités de cholestérol libre ou estérifié. Bull.Soc.Chim.Biol.I942, 22, 296.

0)(82) MATHIEU (C):
Sur la teneur en stérols et en lipides d'un insecte (Periplaneta americana) dans les conditions normales et expérimentales. Thèse Pharm. Nancy I939 .

I) (75) MATHIEU (J.), PETIT (A.), POIRIER (P.) et VELLUZ (L.)
Substances naturelles de Synthèse. Paris, Masson, I95I, I4I p.

95) MEUNIER (P), VINET (A):
Chromatographie et mésomérie. Paris, Masson, I947,I24p.

49) MILBRANDT :
Cité par POLONOVSKY (M) et LESPAGNOL (A).

40) MONTIGNIE (E):
Nouvelle réaction de coloration des stérols. Bull. Soc.Chim. I932, 5I, 690.

22) MIYOSKI (A):
in chem. Abst. I930, 24, 5789.

43) NEUBERG (C):
Biochem. Z. I9I3, 56, 500, cité par PESEZ et POIRIER.

39) NOWACZYNSKI (W.J), STEYERNARK (P.R):
The absorption spectra of steroids in phosphoric acid. Arch.Biochem.Biophys. I955, 2, 453-60.

44) OHYAMA (S) :
Journal of Biochemistry (Japan) I938, 27, 395, in chem. Abst. I938, 8466.

69) OTTKE (R.C), TATUM (E.L), ZABIN (I):
Isotopic acetate and isovalerate in the synthesis of ergosterol. J.biol.Chem. I95I, I89, 429-33.

6) (70) PANZER (T) :
Notizen über die chemische Zusammensetzung der Tuberkelbazillen. Ztschr. physiol. Chem. I9I2, 78, 4I4.

99) PESEZ (M):
Comportement de quelques nor-I9 stéroïdes et des étiocalciférols à l'égard des réactions d'halochromie et d'halofluorie. Bull. Soc. Chim.I958, 369-7I.

I28) (97) PESEZ (M), POIRIER (P) :
Méthodes et réactions de l'analyse organique. Paris, Masson, I954, III.

65) PHAM GIA :
Contribution à l'étude numérique et pondérale de la multiplication microbienne. Thèse Pharm. Paris, I947.

52) PICARD (C.W), SEYMOUR (D.E) :
Cholesterol from wool alcohols. J. Soc. Chem. Ind.I945, 64, 3045, in Chem.Abst.I946, 2265.

93) POLONOVSKI (M), LESPAGNOL (A):
Chimie organique biologique, Paris, Masson, I94I, 856 p.

(I25) POPJAK (G) :
Biosynthesis of squalene and cholesterol in vitro from acetate -I-CI4. Arch. Biochem. Biophys. I954, 48, I02-I06.

(II5) RABINOWITZ (J.L), GURIN (S):
Biosynthesis of cholesterol and β hydroxy β methyl glutaric acid by extracts of liver. J. biol. Chem.I954, 208, 306-I3.

(I37) RAVEUX (R) :
Formation des lipides par Sterigmatocystis nigra. Etude quantitative. Bull. Soc.Chim. Biol. I948, 30, 346-66.

(III) RITTENBERG (D), SCHOENHEIMER (R) :
Deuterium as indicator in study of intermediary metabolism; further studies on biological uptake of deuterium organic substances with special reference to fat and cholesterol formation. J.biol.Chem. I937, I2I, 235-53.

(4I) (46) ROSENHEIM (O) :
A specific colour reaction for ergosterol. Biochem. J. I929, 23, 47-53.

(I08) ROSENKRANTZ (H) :
Infra-red absorption of sterols. I. Ergosterol and related sterols. II. Cholesterol and related sterols. J. biol. Chem. I952, I95, 503-7, 509-I4.

(II6) RUDNEY (H):
The synthesis of β hydroxy β methylglutaric acid in rat liver homogenates. J.Am. Chem. Soc. I954, 76, 2595.

(II7) RUDNEY (H), FERGUSON (J.J) :
Biosynthesis of β hydroxy β methylglutaryl coenzyme A. J. am.Chem. Soc. I957, 79, 5580-I.

(37) SAIFFER (A), KAMMERER (O.F) :
Photometric determination of total cholesterol in plasma or serum by a modified Liebermann-Burchardt reaction. J.biol. Chem. I946, I64, 657-77.

(30) SALKOWSKI (E) :
Z. anal. Chem. I872, II, 443, cité par PESEZ et POIRIER.

(90) SCHOENHEIMER (R), DAM (H) :
Über die Spaltbarkeit und Löslichkeit von Sterindigitoniden. Ztschr. physiol. Chem. I933, 2I5, 59.

(56)(I00) SCHOENHEIMER (R), SPERRY (W.M) :
Micromethod for determination of free and combined cholesterol. J.biol. Chem. I934, I06,745.

6I) SCHULZ (G) :
Über Cholesterin-Tomatid. Eine neue Molekülverbindung zur Analyse and präparativen Gewinnung von Steroiden Ztschr. physiol. Chem. I957, 308, I22-6.

83) SCHWENCK (E), ALEXANDER (G.J), STOUDT (T.H), FISH (C.A): Studies on the biosynthesis of cholesterol. Formation of cholesterol precursors by yeast. Arch. Biochem. Biophys. I955, 55, 274-85.

64) SEAMAN (G.R) :
The presence of sterols in Tetrahymena Geleii. J. Cell. Comp. Physiol. I950, 36, I29-3I.

26) (67) SIFFERD (R.H), ANDERSON (J) :
Über das Vorkommen von Sterinen in Bakterien. Ztschr. physiol. Chem. I936, 239, 270-72.

I27) SOBEL (H) :
Squalene in sebum and sebum-like materials. J. invest. Dermatol. I949, I3, 333.

II2) SONDERHOFF (R), THOMAS (H) :
Lieb. ann. I937, 530, I95 cité par CHEVALLIER.

36) SPERRY (W.M), BRANDT (F.C) :
The colorimetric determination of cholesterol. J. biol. Chem. I943, I50, 3I5-24.

79)(87) (I02) (I32) SPERRY (W.M.), WEBB (M):
A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. J.biol. Chem.I950, I87, 97-I06.

74) STOLL (S):
Les méthodes chromatographiques au service de la Chimie des aliments. In: Mises au point de Chimie analytique pure et appliquée et d'analyse bromatologique publiées par J.A. GAUTIER. Paris, Masson I954, 90-I07.

7) TAMURA (S):
Zur Chemie der Bakterien. Ztschr. physiol.Chem.I9I3, 87, 85.

I4) TAMURA (S).
Zur Chemie der Bakterien. Ztschr. physiol. chem. I9I4, 89, 299.

I22) TCHEN (T.T.) et BLOCH (K.):
Conversion of squalene to lanasterol in vitro. J.biol. Chem. I957, 226, 92I-930.

2I) TCHEN (T.T.) et BLOCH (K):
Mechanism of enzymic cyclization of Squalene. J.biol. Chem.I957, 226, 93I-9.

8) THIVOLLE (L.), WEISKOPF (H):
La chromométrie et ses applications microanalytiques. Trav. Membres. Soc. Chim.biol. I943, 25, I305-08.

8) TSCHUGAEFF (L) :
Chem. Ztg. I900, 24, 542, cité par PESEZ et POIRIER.

) TSUDA (K), AKAGI (S), KISHIDA (Y):
in Pr. Med. I958, 66, 58.

6) TULASNE (R), WURTZ (B) :
Essais de culture de colibacilles sur milieu synthétique. C.R. Soc. phys. biol. Fr. I944, I8, N°72.

06) VELLUZ (L), PETIT (A), PESEZ (M) :
Recherches sur la séparation des cétostéroïdes. IV. Précipitation par la digitonine de stéroïdes sans hydroxyle libre. Bull. Soc. Chim. I946, 558.

8) VELLUZ (L), GOFFINET (B), WARNAM (J) , AMIARD (G):
Nor I9 cholesterol et dehydro-7 nor- I9 cholesterol. Bull. Soc. Chim. I957, I289-9I.

76) VIGNERON (M) :
Fractionnemen s par solvants. Paris, Vigot, I954, I5I p.

2) WHITBY (G.S) :
Some new reactions for the detection of sterols . J. Biol.Chem. I923, I7, 5-I2.

3) WILLIAMS (C.H), BLOOR (W.R), SANDHOLZER (L.A):
Study of lipids of certain enteric bacilli. J.Bact.I939, 37, 30I-3I3.

4) (I04) WINDAUS (A) :
Uber die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. Ber. dtsch. chem. Gesellsch. I909, 42, 238.

4) (89) WINDAUS (A):
Uber die quantitative Bestimmung des Cholesterins and der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren. Ztschr. physiol. Chem. I9I0, II5, II0-I7.

I8) ZABIN (I), BLOCH (K):
Utilisation of isovaleric acid for the synthesis of cholesterol. J.biol. Chem. I950, I85, I3I-8.

7) ZLATKIS (A), ZAK (B), BOYLE (A):
A new method for the direct determination of serum cholesterol. J.Lab.Clin. Med.I953, 4I, 486-92.

o°o

- TABLE DES MATIERES -

Pages

T-PROPOS

RODUCTION 1

itre I : LES STEROLS CHEZ LES BACTERIES. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 3

I. LES MYCOBACTERIACEAE 4
II. LES CORYNEBACTERIACEAE 7
III. LES ENTEROBACTERIACEAE 7
IV. LES AZOTOBACTERIACEAE 9

itre II : ANALYSE SOMMAIRE DES METHODES DE CARACTERISATION ET DE DOSAGE DES STEROLS I0

I. REACTIONS COLOREES I2

A. REACTIONS D'HALOCHROMIE et d'HALO-FLUORIE I2

a) Réactions sous l'action des acides I3

I) Acide sulfurique
2) Réaction de Salkowski
3) Réaction de Liebermann
4) Acide phosphorique
5) Réaction de Montignié
6) Réaction de Rosenheim

b) Réactions obtenues en présence d'aldéhydes I5

I) Réaction de Whitby
2) Réaction de Neuberg
3) Réaction d'Ohyama

c) Réactions obtenues avec des composés divers. I6

B. EMPLOI DE REACTIFS SALINS I7

II. REACTIONS DE PRECIPITATION I7

III. METHODES PHYSIQUES I8

A. SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'INFRAROUGE I8

B. MESURE DE TENSION SUPERFICIELLE I9

itre III: OBTENTION DE QUANTITES IMPORTANTES DE ESCHERICHIA COLI DANS LE BUT D'Y RECHERCHER LES STEROLS 20

I. CHOIX DU MICROORGANISME 21
II. CHOIX DU MILIEU DE CULTURE 22
III. MODE DE CULTURE 23
IV. RECOLTE DES GERMES 27

pitre IV : MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE CHEZ ESCHERICHIA COLI DE CORPS DONNANT LES REACTIONS DES STEROLS. 28

I. EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX 30
II. SAPONIFICATION 34
III. CHROMATOGRAPHIE DE L'INSAPONIFIABLE 35

A. TECHNIQUE DE LANGDON ET BLOCH 38
B. TECHNIQUE DE CMELIK 38
C. TECHNIQUE PERSONNELLE 40

IV. DOSAGES DES STEROLS 41

A. REACTION DE LIEBERMANN SUR L'INSAPONIFIABLE SEPARE PAR CHROMATOGRAPHIE 41
B. METHODE DE SPERRY-WEBB 42

Etablissement de la gamme
Dosage du stérol contenu dans l'insaponifiable de Esch. coli

C. METHODE DE WINDAUS-CAMINADE 48

V. RESULTATS EXPERIMENTAUX 51

pitre V : ETUDE DU STEROL ISOLE DE ESCHERICHIA COLI 57

I. POINT DE FUSION 60
II. ANALYSE ELEMENTAIRE 61
III. ETUDE CRITIQUE DE LA REACTION DE LIEBERMANN. 62

Etude cinétique de la réction de Liebermann.

Courbes d'absorption des colorations obtenues.

IV. FORMATION D'UN COMPLEXE AVEC LE DIGITONOSIDE 71
V. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET 72
VI. SPECTRE D'ABSORPTION EN SOLUTION SULFURIQUE 74
VII. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'INFRA-ROUGE 77

VIII. SPECTRE DE DIFFRACTION DES RAYONS X 8I
DISCUSSION 83

itre VI : ESSAIS TENTES DANS LE BUT D'AUGMENTER LA TENEUR EN "STEROLS" DE ESCHERICHIA COLI 85

I. ADDITION AU MILIEU DE CULTURE DE COMPOSES INTERMEDIAIRES DANS LA BIOSYNTHESE DES STEROLS 86

A. RECHERCHE DU SQUALENE CHEZ ESCHERICHIA COLI 90

a) Généralités sur le squalène 90
b) Expériences personnelles 92

I) Emploi de la réaction de Sobel
2) Formation d'hexachlorure de squalène

B. UTILISATION DE DIFFERENTS SUBSTRATS CARBONES CONNUS POUR ETRE DES INTERMEDIAIRES DANS LA BIOSYNTHESE DES STEROLS 94

I) Culture sur acétate 94
2) Culture sur acide $\beta\beta$'diméthylacrylique 97
3) Culture en présence de squalène..... I02
4) Culture en présence de leucine..... I03

II. ADDITION AU MILIEU DE CULTURE DE CORPS QUI NORMALEMENT MODIFIENT LA TENEUR DES MICROORGANISMES EN LIPIDES I04

A. CULTURE SUR GLYCEROL I04

B. CULTURE SUR MILIEU HYPERTONIQUE I05

CONCLUSIONS GENERALES I07

LIOGRAPHIE III

o
o)o

UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

-:-:-:-:-:-

T H E S E

présentée par Mademoiselle DAUCHY Simone

Née le 30 Août 1930 à MEZIERES

Nationalité: Française,

et portant le titre:

Sur la présence de stérols chez un microorganisme (Escherichia coli) : Isolement, caractérisation, discussion.

Vu,

NCY, le 2 Juillet 1958

Président de thèse,

F. KAYSER.

Vu et approuvé

NANCY, le 2 Juillet 1958.

Le Doyen de la Faculté,

F. KAYSER.

Vu et permis d'imprimer

NANCY, le 3 Juillet 1958

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

G. MAYER.